

ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ

Том 20 №4



Problems in medical mycology

Vol.20 №4

2018

EDITORIAL BOARD

Chief Editor —

N.V. Vasilyeva — Ph.D., prof. (Russia)

Deputies Chief Editor —

N.N. Klimko — M.D., prof. (Russia)

A.E. Taraskina — Ph.D. (Russia)

Responsible secretary —

T.S. Bogomolova — Ph.D. (Russia)

SCIENTIFIC EDITORIAL BOARD

J. Bennett — M.D. (USA), B. Dupont — M.D. (France), O.G. Hurzilava — M.D., prof. (Russia), V.I. Golubev — Ph.D. (Russia), K.P. Kashkin — M.D., academician of RAMS, prof. (Russia), Kolbin A.C. — M.D., prof. (Russia), V.I. Mazurov — M.D., academician of RAMS, prof. (Russia), S.M. Ozerskaya — Ph.D. (Russia), I. Polachek — M.D. (Israel), A.V. Samzov — M.D., prof. (Russia), S.V. Sidorenko M.V. — M.D., prof. (Russia), M.V. Shulgina — Ph.D. (Russia), H.J. Tietz — M.D. (Germany), M.A. Viviani — M.D. (Italy), V.A. Zinzerling — M.D., prof. (Russia), Yamaguchi M. — Ph.D. (Japan), Zhang F. — M.D. & Ph.D. (China)

PROBLEMS IN MEDICAL MYCOLOGY

Vol. 20, № 4, 2018

North-Western State Medical University
named after I.I. Mechnikov
Kashkin Research Institute
of Medical Mycology (KRI MM)

ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ

Том 20, № 4, 2018

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова (СЗГМУ)
Научно-исследовательский институт
медицинской микологии им. П.Н.Кашкина
(НИИ ММ)

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор —

Н.В. Васильева — д.б.н., профессор (Россия),

Заместители главного редактора:

Н.Н. Климко — д.м.н., профессор (Россия)

А.Е. Тараскина — к.б.н. (Россия)

Ответственный секретарь —

Т.С. Богомолова — к.б.н. (Россия)

НАУЧНО-РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Дж. Беннетт — доктор медицины (США),
М.А. Вивиани — доктор медицины (Италия),
В.И. Голубев — д.б.н. (Россия), Б. Дюпон —
доктор медицины (Франция), К.П. Кашкин —
д.м.н., академик РАМН, профессор (Россия),
Колбин А.С. — д.б.н., профессор (Россия),
В.И. Мазуров — д.м.н., акад. РАМН, профессор
(Россия), С.М. Озерская — д.б.н. (Россия),
И. Полачек — доктор медицины (Израиль),
А.В. Самцов — д.м.н., профессор (Россия),
С.В. Сидоренко — д.м.н., профессор (Россия),
Х-Й. Титц — доктор медицины (Германия),
О.Г. Хурцилава — д.м.н., проф. (Россия),
В.А. Цинзерлинг — д.м.н., профессор (Россия),
Чжан Ф. — доктор медицины (Китай),
М.В. Шульгина — д.б.н. (Россия), М. Ямагучи —
доктор медицины (Япония)

Проблематика журнала: Фундаментальные и прикладные аспекты медицинской микробиологии — биология возбудителей, клиника, диагностика, эпидемиология, иммунитет, терапия и профилактика инфекций, микроорганизмы-контаминанты в лабораторных, клинических и других условиях.

Editorial policy: The Journal «Problems in Medical Mycology» specializes in original articles that describe innovative research on all aspects of Medical Microbiology — biology of pathogens, clinic, diagnostic, epidemiology, immunity, therapy and prophylaxis of infections, microorganisms — contaminants in laboratory, clinical and other conditions.

СОДЕРЖАНИЕ

ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ И ОБЗОРЫ

<i>Диникина Ю.В., Белогурова М.Б.</i> Инвазивный кандидоз у детей с онкологическими заболеваниями: эпидемиология, диагностика (обзор)	3
<i>Борзова Ю.В., Десятник Е.А., Попова В.В., Тимирбаева О.Ю., Богомолова Т.С., Степанова А.А., Клишко Н.Н., Васильева Н.В.</i> Первый случай успешного лечения кокцидиоидоза в России. Описание случая и обзор литературы.	10

КЛИНИЧЕСКАЯ МИКОЛОГИЯ

<i>Козлова Я.И., Фролова Е.В., Учеваткина А.Е., Филиппова Л.В., Митрофанов В.С., Аак О.В., Соловьева Г.И., Кузнецов В.Д., Васильева Н.В., Клишко Н.Н.</i> Диагностические возможности теста активации базофилов в выявлении аллергического бронхолегочного аспергиллеза у больных бронхиальной астмой	15
<i>Боровицкий В.С., Разин М.П., Утенкова Е.О., Барамзина С.В.</i> Структура грибковой инфекции у больных туберкулезом, сочетанным с ВИЧ-инфекцией, в лечебном учреждении Федеральной службы исполнения наказаний	20
<i>Евсеев П.Ю., Белоказанцева В., Кондакова М.Н., Елькин А.В., Борзова Ю.В., Десятник Е.А., Богомолова Т.С., Игнатьева С.И., Шульгина М.В., Клишко Н.Н.</i> Хронический аспергиллез у пациентов с деструктивным туберкулезом легких	24
<i>Авдеенко Ю.Л., Медведева Т.В., Степанова А.А., Черныш Д.Б.</i> Гистологические особенности трихофитии кожи голени, обусловленной <i>Trichophyton verrucosum</i> (описание случая)	27
<i>Харисова А.Р., Хисматуллина З.Р.</i> Трудности в диагностике инфильтративно-нагноительной микроsporии. Клинический случай	31
<i>Кимайкина О.В., Найданов В.Ф., Бурков Д.В., Баженов П.А., Супрун Е.А., Золовкина А.Г., Васильева Н.В., Тараскина А.Е., Выборнова И.В., Богомолова Т.С., Григоричева Л.Г.</i> Грибковые инфекции суставов. Случаи из практики	34

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МИКОЛОГИЯ

<i>Степанова А.А., Чилина Г.А., Баракаева Ф.Р.</i> Сканирующая электронная микроскопия <i>Aspergillus fumigatus</i> Fres.	39
<i>Степанова А.А., Авдеенко Ю.Л., Шульгина М.В., Сидоренко С.В.</i> Гистологическое исследование трех случаев микотического риносинусита	43
<i>Афиногенова А.Г., Квиникадзе Г.Э., Спиридонова А.А., Афиногенов Г.Е., Линник С.А., Мадай Д.Ю.</i> Микробиологическое обоснование создания композиции на основе костного цемента с пролонгированным антимикробным действием в отношении гентамицин-устойчивых <i>Staphylococcus epidermidis</i>	49
<i>Степанов А.С., Васильева Н.В., Щербина Е.С., Каменева О.А., Косякова К.Г.</i> Резистентность различных серогрупп <i>Streptococcus</i> spp. к антимикробным препаратам	55

CONTENTS

PROBLEM ARTICLES AND REVIEWS

<i>Dinikina Y.V., Belogurova M.B.</i> Invasive candidiasis in children with malignancies: epidemiology, diagnosis (review)	3
<i>Borzova Yu.V., Desyatnik E.A., Popova V.V., Timirbaeva O.Y., Bogomolova T.S., Stepanova A.A., Klimko N.N., Vasilyeva N.V.</i> First case of successful treatment of coccidioidomycosis in Russia. Case description and literature review	10

CLINICAL MYCOLOGY

<i>Kozlova Y.I., Frolova E.V., Uchevatkina A.E., Filippova L.V., Mitrofanov V.S., Aak O.V., Solovyova G.I., Kuznetsov V.D., Vasilyeva N.V., Klimko N.N.</i> Diagnostic possibilities of basophil activation test in the identification of allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with asthma	15
<i>Borovitsky V.S., Razin M.P., Utenkova Ye.O., Baramzina S.V.</i> Structure of the fungal infection in patients with tuberculosis, combined with HIV-infection in a medical institution of the Federal Penitentiary Service.	20
<i>Evseev P.Y., Belokazanceva V., Kondakova M.N., Elkin A.V., Borzova Y.V., Desyatnik E.A., Bogomolova T.S., Ignatieva S.I., Shulgina M.V., Klimko N.N.</i> Chronic aspergillosis in adult patients with chronic destructive pulmonary tuberculosis.	24
<i>Avdeenko Y.L., Medvedeva T.V., Stepanova A.A., Chernysh D.B.</i> Histological peculiarity of the shin trichophytia caused by the <i>Trichophyton verrucosum</i> (description of the case)	27
<i>Kharisova A.R., Hismatullina Z.R.</i> Difficulties in diagnostics of infiltrative-suppurant microsporidia. Clinical case	31
<i>Kimajkina O.V., Grigoricheva L.G., Naidanov V.F., Burkov D.V., Bazhenov P.A., Suprun E.A., Zolovkina A.G., Vasilyeva N.V., Taraskina A.E., Vybornova I.V., Bogomolova T.S.</i> Fungal joint infection. Case reports	34

EXPERIMENTAL MYCOLOGY

<i>Stepanova A.A., Chilina G.A., Barakaeva F.R.</i> Scanning electron microscopy of <i>Aspergillus fumigatus</i> Fres.	39
<i>Stepanova A.A., Avdeenko Y.L., Shulgina M.V., Sidorenko S.V.</i> Histological investigation of the tree cases of mycotic rhinosinusitis	43
<i>Afinogenova A.G., Kvinikadze G.E., Spiridonova A.A., Afinogenov G.E., Maday D.Yu.</i> Microbiological evaluation of the compositions based on bone cement with prolonged antimicrobial action against gentamicin-resistant <i>Staphylococcus epidermidis</i>	49
<i>Stepanov A.S., Vasilyeva N.V., Shcherbina E.S., Kameneva O.A., Kosyakova K.G.</i> Resistance of <i>Streptococcus</i> spp. serogroups to antimicrobial agents.	55

ИНВАЗИВНЫЙ КАНДИДОЗ У ДЕТЕЙ С ОНКОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ: ЭПИДЕМИОЛОГИЯ, ДИАГНОСТИКА (ОБЗОР)

^{1,2}Диникина Ю.В. (зав. отделением, доцент кафедры)*, ^{1,2}Белогурова М.Б. (в.н.с., зав. кафедрой)

¹ Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова; ² Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет (кафедра онкологии, детской онкологии и лучевой терапии), Санкт-Петербург, Россия

© Диникина Ю.В., Белогурова М.Б., 2018

Несмотря на достигнутый прогресс в эффективности проводимой противоопухолевой терапии у детей с онкологическими заболеваниями, вопросы инфекционно-опосредованной летальности остаются высоко актуальными и требуют внимания специалистов. За последние десятилетия отмечено увеличение распространенности инвазивного кандидоза (ИК) у различных контингентов больных, при этом особую опасность заболевание представляет для пациентов в период постцитостатической иммуносупрессии, когда его течение сопровождается тяжелыми жизнеугрожающими осложнениями. Ранняя диагностика ИК является сложной задачей по причине неспецифичности клинических признаков, трудностей получения биосубстратов для микологического подтверждения диагноза у больных с химиоиндуцированной панцитопенией. Результаты лечения ИК напрямую зависят от своевременной постановки диагноза и адекватности проводимой антифунгальной терапии.

В статье приведены актуальные данные литературы по эпидемиологии и диагностике инвазивного кандидоза у детей с онкологическими заболеваниями.

Ключевые слова: инвазивный кандидоз, дети, антифунгальная терапия, онкогематология, кандидемия

INVASIVE CANDIDIASIS IN CHILDREN WITH MALIGNANCIES: EPIDEMIOLOGY, DIAGNOSIS (REVIEW)

^{1,2}Dinikina Y.V. (head of the clinical department, associate professor of the department),
^{1,2}Belogurova M.B. (leading scientific collaborator, head of the department)

¹Almazov National Medical Research Center; ²St. Petersburg State Pediatric Medical University (Department of Oncology, Children's Oncology and Radiation Therapy), St. Petersburg, Russia

© Dinikina Y.V., Belogurova M.B., 2018

Despite the significant progress that has been made in anticancer therapy in children with malignancies, the issues concerning infection-related mortality are increasingly important and require high attention. The incidence rates of invasive candidiasis in different patient groups has increased in the last decades, meanwhile it is critically dangerous in immunocompromised patients, when it is associated with life threatening complications. Early diagnostics of invasive candidiasis is major challenge because of non-specific signs of disease and difficulties in sample collection for

* Контактное лицо: Диникина Юлия Валерьевна,
e-mail: dinikinayulia@mail.ru

mycological verification of diagnosis in patients with chemotherapy induced pancytopenia. Treatment results highly depend on prompt diagnostics and adequate antifungal therapy.

The actual literature data in epidemiology and diagnostics of invasive candidiasis in children with oncological diseases have been presented in the article.

Key words: invasive candidiasis, children, antifungal therapy, oncohematology, candidemia

Грибы рода *Candida* у детей являются основными возбудителями внутрибольничных инвазивных микозов (ИМ) с возрастающей частотой за последние десятилетия [1, 2]. Несмотря на то, что ИК продолжает обуславливать высокий процент инфекционно-опосредованной летальности у детей с онкологическими заболеваниями, в международной литературе ограничено число публикаций, характеризующих его течение у данной когорты больных [3, 4].

Ориентировочное общее число случаев инвазивного кандидоза (ИК) в год, регистрируемых в мире, составляет около 250 000, при этом распространенность в зависимости от региона и популяции больных значительно различается. Оценка истинной распространенности является сложной задачей ввиду частой регистрации случаев вероятной и микробиологически неподтвержденной инфекции [5].

Несмотря на схожесть аспектов течения ИК у детей и взрослых, в большом количестве проведенных исследований продемонстрировано наличие принципиальных возрастных различий в факторах со стороны пациента, фармакокинетики, исходах [2, 6].

Одну из основных групп риска по развитию ИК составляют дети с онкогематологическими заболеваниями, при этом ведущим фактором риска в этой популяции является нейтропения [1-3, 5]. Важно подчеркнуть, что используемые режимы химиотерапии в детской онкологии являются более агрессивными и отличаются большей степенью иммуносупрессии по сравнению с взрослыми [7]. По данным Zaoutis T. и соавторов, указанная когорта больных, включая реципиентов ТГСК (трансплантация гемопоэтических стволовых клеток), составляет около 20% всех случаев ИК у детей [6]. Стратификация эпизодов фебрильной нейтропении по степени риска инвазивных микозов, в том числе ИК, у больных онкологического профиля с учетом клинико-лабораторных параметров, коморбидного фона и генетических факторов является первостепенной в определении объема диагностики, тактики лечения и прогноза [8].

Клиническая картина ИК, как правило, неспецифична и в большинстве случаев имеет общеклинические признаки инфекционного процесса, что в ряде случаев приводит к поздней диагностике и несвоевременному началу антифунгальной терапии [1, 5].

На сегодняшний день разработаны международные рекомендации по ведению ИК у онкологических больных, в том числе для детской популяции, однако не следует пренебрегать индивидуальными особенностями пациента, клиническими проявлениями заболевания при принятии решения о выборе лечения в каждом конкретном случае [1, 9].

Летальность от ИК в педиатрии превышает 15%, а в случаях иммуносупрессии может достигать 60% [1, 6]. Отметим, что случаи инвазивного микоза, обусловленного *Candida spp.*, приводят к значимому уве-

личению сроков госпитализации, продолжительности и стоимости лечения [1]. Упомянутые факторы делают актуальными вопросы проведения эффективной профилактики ИК у пациентов, находящихся в группе риска [10].

Эпидемиология, факторы риска инвазивного кандидоза у детей с онкологическими заболеваниями.

Ретроспективный анализ случаев ИК в детской популяции различными исследовательскими группами дает представление об эпидемиологии и факторах риска его возникновения [2, 6, 10, 11]. На сегодняшний день имеется недостаточное количество эпидемиологических данных по ИК у пациентов с онкологическими заболеваниями [3, 12]. Число проводимых мультицентровых проспективных исследований, в том числе на территории РФ, крайне мало [5, 12]. Показатель распространенности ИК среди отдельных стран различается, в некоторых из них – с тенденцией к неуклонному росту (США), и в общей популяции варьирует от 2 до 23 на 100 000 населения/год [1, 5, 13]; показатель распространенности ИК в РФ составляет 8,3 [1].

Оценка истинной частоты развития ИК у детей с онкологическими заболеваниями ограничена, что обусловлено различиями в использовании методов диагностики и их последующей трактовке, особенностями популяции пациентов, трудностями в верификации возбудителя в случаях проведения профилактической или эмпирической противогрибковой терапии [14-16]. С учетом опубликованных когортных исследований за последние десятилетия частота инвазивных оппортунистических микозов составляет $\approx 10\%$ и может быть выше при остром миелобластном лейкозе (ОМЛ), рецидивах острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) и после аллогенной ТГСК; в то время как у пациентов с ОЛЛ заболеваемость ИМ зависит от используемого протокола лечения и кумулятивных факторов риска. У лиц с неходжкинскими лимфомами и после аутологичной ТГСК заболеваемость значительно ниже ($<5\%$), она является спорадической у больных с лимфомой Ходжкина, опухолями центральной нервной системы (ЦНС) и другими солидными злокачественными новообразованиями [14, 16]. По результатам одного из самых крупных ретроспективных мультицентровых эпидемиологических исследований (2004 г.), частота ИМ у пациентов с онкологическими заболеваниями в среднем составляет 4,6% (0,5-12%), при этом частота ИК – 1,6%. При сравнении случаев ИМ, обусловленного дрожжевыми и плесневыми грибами, выявлено соотношение 33% vs 58% соответственно [17]. Частота ИК у пациентов после аутологичной и аллогенной ТГСК составляет 1,1% и 0,8% соответственно, что обусловлено большей частотой развития инвазивного аспергиллеза в когорте больных после аллогенной ТГСК [12]. В ретроспективном европейском обсервационном исследовании распространенность ИК составила 0,47-1,57/1000 госпитализаций у пациентов онкогематологического профиля, при этом наибольший процент случаев зарегистрирован у лиц с ТГСК (43,8%) и при наследственных мальформациях/синдромах (21,9%) [18]. По данным Zaoutis T. и соавторов, показатель распространенности ИК в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) составляет 3,5/1000 госпитализаций [10].

Группой BFM (Berlin-Frankfurt-Münster – Берлин-

Франкфурт-Мюнстер – исследовательская группа по лечению острых лейкозов у детей) по терапии ОМЛ были представлены данные о частоте ИМ в идентичных когортах, которая составила 5% при использовании протокола BFM'93 [19] и 3% – версии с интенсификацией химиотерапии BFM'2004 [20, 21]. Снижение частоты развития ИМ в протоколе BFM 2004 частично обусловлено назначением антимикотической терапии (преимущественно с антиплесневой активностью) в качестве профилактики ($>70\%$ циклов химиотерапии) [20, 21]. Высокая частота (14-23%) и летальность (*Candida* spp. – 17,6%, *Aspergillus* spp. – 26,1%), ассоциированная с ИМ у пациентов с ОМЛ, продемонстрирована исследователями Children's Cancer Group (CCG) [21, 22], а также в протоколе ELAM 02, с частотой ИМ 6,7% [21, 23].

При проведении анализа опубликованных ретроспективных эпидемиологических данных по ИМ очевидны отличия в частоте заболеваемости в зависимости от региона проживания, оцениваемой когорты пациентов, используемых протоколов противоопухолевой терапии, сопроводительного лечения, в том числе противогрибковой профилактики. Например, в исследованиях групп BFM и CCG при ОМЛ у детей значимо отличается частота применения препаратов с антиплесневой активностью в качестве профилактики – 63,8% vs 14,4% соответственно [24]. Также нельзя исключить риски гипердиагностики (несоответствие критериям EORTC/MSG – European Organization for Research and Treatment of Cancer/ Mycoses Study Group – Европейская организация по исследованию и лечению рака/ исследовательская группа по микозам), приводящей к необоснованному применению противогрибковой терапии [1, 5, 21, 23].

Основными возбудителями при кандидемии (как наиболее частого варианта ИК, составляющего 75-90% всех случаев) у детей с онкогематологическими заболеваниями являются *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, реже выделяют *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. rugosa*, *C. kefyr* и др. [1, 5, 12, 14]. В последние годы в большинстве стран отмечают возрастание частоты выделения не-*albicans* видов *Candida* [5, 25, 26] в случаях инвазивного кандидоза, при этом обнаружено снижение чувствительности к флуконазолу у большинства возбудителей [1, 12]. Данные о высокой частоте (72%) развития «прорывной» кандидемии при использовании противогрибковых агентов с целью профилактики других видов ИМ были получены в исследовании MDACC (MD Anderson Cancer Center – онкологический центр им. М.Д. Андерсона), при этом большая часть (76%) была ассоциирована не с *C. albicans* [26].

Причинами перераспределения соотношения возможных возбудителей ИК в сторону селекции не-*albicans* видов некоторые авторы считают использование флуконазола в качестве профилактики, а также длительность его применения [27, 28]. Кроме того, в ряде исследований выявлена тенденция к снижению частоты *Candida*-ассоциированных микозов, обусловленная увеличением случаев аспергиллеза в некоторых когортах больных [3, 12, 29]. Отмечено, что виды *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* ассоциированы с тяжелым течением, сниженной/отсутствующей чувствительностью к флуконазолу, высокой летальностью [1,

2, 5, 12, 27-29].

Частота диссеминации при кандидемии составляет 10-20%, тяжелого сепсиса или септического шока – 30%. Показатель летальности варьируется, тем не менее, он остается на недопустимо высоком уровне (от 10 до 25%) и близок к 50% у пациентов в ОРИТ [1, 5, 14].

На сегодняшний день отсутствует строгая общепринятая классификация факторов риска развития ИК, что в первую очередь связано с гетерогенностью популяции пациентов при проведении исследований ИК, а также большим числом сопутствующих состояний, вероятно, оказывающих влияние на заболеваемость ИК. Факторы риска развития ИМ у детей с онкологическими заболеваниями и после ТГСК схожи с взрослой популяцией, первостепенными из них являются [1, 5, 14, 15, 29]:

1) персистирующая глубокая нейтропения (абсолютное число нейтрофилов ≤ 500 кл/мкл ≥ 10 дней);

2) использование глюкокортикостероидов более 3-х недель в дозах $\geq 0,3$ мг/кг/сут. по преднизолону/или эквивалентные дозы дексаметазона;

3) полное парентеральное питание ≥ 14 дней;

4) наличие центрального венозного катетера (ЦВК);

5) нарушение целостности слизистых оболочек.

На основании проводимого многофакторного анализа в когорте детей с онкологическими заболеваниями наибольший риск ИМ отмечен при ОМЛ, ОЛЛ, рецидиве ОЛЛ, пребывании в ОРИТ, ТГСК, а также РТПХ (реакция трансплантат против хозяина) [14].

В исследовании Zaoutis T. и соавторов были выявлены предикторы и факторы риска развития кандидемии у детей, получающих лечение в ОРИТ [10]: ЦВК, наличие злокачественного новообразования, использование ванкомицина >3 дней, применение антибактериальной терапии в отношении анаэробных патогенов > 3 дней. Учитывая вышеперечисленные факторы, осуществляли ретроспективный анализ с целью определения вероятности кандидемии, которая варьировала от 10,7% до 46%, при этом самая высокая частота была зарегистрирована у больных с сочетанием всех вышеперечисленных факторов с проведением полного парентерального питания [10]. В исследовании подчеркнута доминирующая роль нарушенного барьера слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта с возможностью транслокации клеток *Candida* в кровоток в развитии кандидемии у пациентов с онкологическими заболеваниями вследствие цитотоксической химиотерапии, а также использования массивной антибактериальной терапии [5, 10, 30]. Применение антибиотиков с анаэробной активностью оказывает негативный эффект на анаэробную биоту желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), в норме препятствующую колонизации *Candida* spp. [10, 31].

Помимо вышеперечисленных факторов, важно учитывать спектр наиболее частых возбудителей ИМ в стационаре, а также распространенность в условиях конкретного отделения [32].

Из всех вышеуказанных факторов риска и предикторов ИК наиболее значимым является постцитостатическая нейтропения, вероятность развития которой напрямую связана с интенсивностью противоопухолевой терапии [3, 29]. Детскими онкологами был принят консенсус в отношении 34 типов онкологических заболеваний у детей и соответствующей им противо-

опухолевой терапии, что позволило разработать валидную классификацию по уровням интенсивности – от минимально интенсивной (уровень 1) до очень интенсивной (уровень 4) (табл. 1) [33]. При разработке рейтинга интенсивности во внимание принимали следующие факторы: общая продолжительность лечения, возможные побочные эффекты, количество используемых противоопухолевых агентов, опции терапии и их сочетание, сроки пребывания в стационаре до перехода в режим дневного стационара [29].

Таблица 1

Уровни интенсивности противоопухолевой терапии: 3 и 4

Уровень 3: очень интенсивная терапия	Уровень 4: наиболее интенсивная терапия
Противорецидивная терапия: лимфома Ходжкина, опухоль Вилмса (рецидив 1)	Противорецидивная терапия (исключение: лимфома Ходжкина, 1-й рецидив опухоли Вилмса)
ОЛЛ (высокий и очень высокий риски)	ТГСК – при всех нозологиях
ОМЛ, ОМЛ при синдроме Дауна	ОМЛ
Острый промиелоцитарный лейкоз (ОПЛ)	ЮММЛ с ТГСК
Опухоли ЦНС ≥ 2 -х опций терапии	
Саркома Юинга	
Гепатобластома (M+)	
Лимфома Ходжкина (стадия 3В/4В/высокий риск)	
Ювенильный миелоцитарный лейкоз (ЮММЛ) – до ТГСК	
Назофарингеальная карцинома	
Нейробластома (стадия 3/4) – без трансплантации костного мозга (ТКМ)	
Неходжкинские лимфомы (стадия 4)	
Остеосаркома	
Рабдомиосаркома (стадия 3/4)	
Опухоль Вилмса (стадия 3/4)	

В соответствии с проводимыми исследованиями наиболее высокий риск развития ИМ, в том числе ИК, будет у детей, получающих противоопухолевое лечение 3 и 4 уровней интенсивности [29].

Использование предиктивных моделей в повседневной практике лежит в основе выбора методов дополнительной диагностики и последующей тактики превентивной, эмпирической или патогенетической терапии.

Диагностика инвазивного кандидоза

Раннее начало антифунгальной терапии улучшает прогноз у пациентов с ИК: взаимосвязь между временным интервалом от появления первых симптомов инфекции до инициации патогенетического лечения и уровнем летальности отражена в проводимых международных исследованиях [1, 2, 5, 34, 35].

Основными вариантами инвазивного кандидоза являются: кандидемия (циркуляция *Candida* spp. в кровеносном русле) и острый диссеминированный кандидоз (75-90% всех случаев ИК), кандидозный перитонит, реже – хронический диссеминированный кандидоз, кандидозный менингит, кандидозная пневмония [1, 2, 5, 12, 29]. В соответствии с оригинальной классификацией EORTC/MSG, ИМ разделяют на «доказанный», «вероятный» и «возможный» [36], при этом следует подчеркнуть, что термины «вероятный» и «возможный» предложены только для иммунокомпromетированных пациентов. Выполнение адекватной диагностики с целью оценки инфекционного статуса является необходимым условием для исключения альтернативных возбудителей и определения процесса как ИМ [36].

В таблице 2 приведены критерии для постановки диагноза «доказанного» ИК.

Таблица 2

Критерии «доказанного» инвазивного кандидоза	
Биологический материал	Особенности при инвазивном кандидозе
Микроскопия: стерильный материал (исключение – слизистая оболочка)	Гистологическое, цитологическое исследование (по Гомори-Грокотту) и (или) микроскопия (окраска калькофлюором белым) стерильного в норме образца: псевдомицелий/мицелий
Культура: стерильный материал; (при получении материала из дренажа <24-часов стояния)	Выявление <i>Candida</i> spp. в биоптате
Кровь	Однократное выделение <i>Candida</i> spp.

Основным условием диагноза «доказанного» ИМ является выделение элементов гриба из пораженной ткани/биологической жидкости независимо от наличия или отсутствия клинических критериев или факторов со стороны пациента [36].

«Золотой» стандарт диагностики ИК – выделение *Candida* spp. из стерильных в норме локусов и жидкостей (кровь, ликвор, перитонеальная, суставная, перикардальная жидкость), при этом положительный результат удается получить лишь у 30-70% пациентов [37]. Согласно рекомендациям ESCMID, при подозрении на кандидемии забор крови необходимо осуществлять ежедневно до выделения культуры в 3 аэробных и 3 анаэробных флакона, 3-хкратно (2-4 раза в пределах 30 мин. путем выполнения повторных венепункций; объемом забираемой крови в зависимости от возраста: вес до 2 кг – 2-4 мл; 2-12 кг – 6 мл, 12-36 кг – 20 мл); инкубационный период – минимум 5 дней. При соблюдении вышеуказанных рекомендаций чувствительность метода будет соответствовать 50-75% и несколько ниже – у пациентов с нейтропенией и в случаях использования антифунгальной профилактики [38]. Данная методика представляется затруднительной у детей, тем не менее, иных рекомендаций в руководстве ESCMID 2012 г. не представлено [39]. Lecciones J. и соавторы описали 155 случаев катетер-ассоциированного кандидоза и показали отсутствие необходимости в проведении забора крови из периферической вены при наличии ЦВК [40]. Время до получения положительного результата в зависимости от вида патогена может составлять от 35 до 150 часов и дольше, что зачастую требует назначения антифунгальной терапии эмпирическим путем [1, 2, 5].

У детей в период постцитостатической цитопении (нейтропения, тромбоцитопения) получение биоптата из очага поражения в большинстве случаев является затруднительным, и риск проведения инвазивной манипуляции может превышать ожидаемую пользу [1, 5].

Согласно результатам проводимых исследований по ИМ у детей, частота «доказанных» случаев варьирует: например, по данным Mor M. и соавторов, она составила 21,3% [29], а в анализе Castagnola E. – 44% [41]; при этом был продемонстрирован высокий уровень выделения возбудителя при ИК [29, 41].

При невозможности идентификации возбудителя диагностики необходимо проводить с учетом совокупности диагностически значимых критериев для ИК и при этом соблюдать соотношение клинических и микробиологических критериев [1, 5, 36, 42, 43]:

Факторы со стороны пациента:

- персистирующая лихорадка > 96 часов, рефрактерная к антибактериальной терапии широкого спектра;
- температура тела > 38 °С или <36 °С при наличии

следующих состояний: продолжительная нейтропения (>10 дней) за последние 60 дней; продолжающаяся иммуносупрессивная терапия или ее недавнее использование (за последние 30 дней); доказанный или возможный эпизод ИМ в предшествующие периоды нейтропении;

- симптомы РТПХ (≥2 степени) или хроническое течение;
- использование кортикостероидов (≥0,3 мг/кг/сут. по преднизолону /или эквивалентные дозы дексаметазона > 3 недель) за последние 60 дней;
- терапия Т-клеточными иммуносупрессорами (циклоsporин, ингибиторы фактора некроза опухолей α (ФНО-α), специфические моноклональные антитела – алемтузумаб) или аналогами нуклеозидов в течение последних 90 дней;
- тяжелый иммунодефицит.

Клинические критерии:

1) Поражение нижних отделов респираторного тракта:

- основные критерии: инфильтративные изменения на КТ (очаги с нечеткими контурами, альвеолярная инфильтрация, симптом «воздушной бронхограммы», инфильтрация по типу «матового стекла», симптом «ореола»);

- малые критерии: симптомы респираторной инфекции (кашель, боли в грудной клетке, кровохарканье); наличие плеврита.

2) Инфекция ЦНС:

- основные критерии: радиологические признаки (КТ/МРТ) – мастоидит/ другие параменингеальные очаги, экстрадуральная эмпиема, паренхиматозные очаги в головном и спинном мозге;

- малые критерии: очаговая неврологическая симптоматика (фокальные судороги, гемипарез, паралич черепных нервов), ментальные нарушения, менингеальные симптомы, изменения цитоза и биохимического анализа ликвора (негативные культуральное исследование и микроскопия на другие патогены, отсутствие опухолевых клеток).

3) Диссеминированный кандидоз: папулезные или узелковые элементы на коже (при отсутствии других возможных этиологических факторов), изменения при офтальмоскопии, характерные для гематогенного грибкового хориоретинита или эндофтальмита.

4) Хронический диссеминированный кандидоз: абсцессы печени и/или селезенки по данным визуализации (КТ – компьютерная томография, МРТ – магнитно-резонансная томография, УЗИ – ультразвуковое исследование); повышение уровня щелочной фосфатазы; наличие микробиологических критериев для постановки диагноза вероятного ИМ является необязательным.

Микологические критерии:

• положительный результат культурального исследования на *Candida* spp.;

• двукратный положительный результат культурального исследования мочи при отсутствии мочевого катетера;

• колонизация *Candida* spp. в моче (при отсутствии мочевого катетера);

Серологическая диагностика:

• совместное определение маннана и антиманнанных антител в сыворотке крови;

• β -D-глюкан (не специфичен для ИК, может быть использован в качестве вспомогательного метода).

Диагноз «вероятного ИМ» может быть установлен при наличии 1 фактора со стороны пациента, 1 микробиологического критерия и 1 главного (или 2-х минорных) клинического критерия в сочетании с признаками очага поражения [36, 43]. Для ИК термин «возможный» не применим [43].

Среди «ранних диагностических тестов» (неинвазивных и некультуральных) следует отметить маркеры маннан/антиманнан, которые на сегодняшний день являются единственными специфичными иммунологическими тестами в отношении ИК. Маннан – основной компонент клеточной стенки *C. albicans*, составляющий до 7% сухого веса клетки, и один из основных антигенов, циркулирующих в кровотоке при течении инфекции. Mikulska M. с соавторами был проведен анализ по использованию указанных тестов в разновозрастных когортах пациентов с гематологическими, онкологическими заболеваниями, получавших терапию в ОРИТ после оперативного лечения. Было показано, что наилучшие показатели чувствительности (83%) и специфичности (86%) достигаются при сочетанном определении антигена (АГ) маннана и антитела (АТ) к маннану. При этом наибольшая чувствительность отмечена для *C. albicans*, в меньшей степени – для *C. glabrata* и *C. tropicalis*. В 73% случаев, по крайней мере, один из серологических тестов определялся как положительный до получения результатов культурального исследования, в среднем за 6 дней для АГ маннана и 7 дней – для АТ к маннану. У пациентов с гепатолиенальным кандидозом в 86% случаев наблюдали положительный результат теста в среднем за 16 дней до появления очагов в печени или селезенке (по причине нейтропении) с использованием радиологических методов диагностики [2, 44]. Специфические исследования в педиатрических когортах больных по использованию вышеописанных тестов крайне ограничены [2].

Отрицательный результат тестов не исключает диагноз ИК, который может быть ассоциирован с другим видом возбудителя [2, 5, 44].

По данным мета-анализа с целью изучения практической определенности (1→3)- β -D-глюкана (полисахарид клеточной стенки грибовой клетки большинства патогенных грибов) в крови для пациентов с онкогематологическими заболеваниями определили, что чувствительность и специфичность для двух последовательных тестов составили 49,6% и 98,9% соответствен-

но [2, 41]. Несмотря на неспецифичность данного теста в отношении *Candida* spp., он в ряде случаев позволяет диагностировать ИК до получения результатов культурального исследования, в связи с чем некоторые авторы делают вывод о возможности его использования в качестве микологического критерия для постановки диагноза или в целях лекарственного мониторинга [14, 45]. Несмотря на многообещающие результаты проводимых исследований, применение данного теста в рутинной практике у больных детского возраста с персистирующей фебрильной нейтропенией невозможно ввиду отсутствия однозначных критериев оценки получаемых результатов [14, 42]. Lehrnbecher T. и соавторы не рекомендуют определение β -D-глюкана для принятия клинического решения у детей с онкологическими заболеваниями [46].

Визуализирующие методы исследования (КТ, МРТ, позитронно-эмиссионная томография, рентгенография, УЗИ, эндоскопия, артроскопия) являются вспомогательными ввиду ограниченного набора специфических признаков ИК и, тем не менее, включены в критерии диагностики ИМ [1, 5, 14, 36, 42, 43, 47, 48]. Согласно рекомендациям по ведению фебрильной нейтропении у детей с онкологическими заболеваниями, в группе высокого риска при персистирующей лихорадке ≥ 96 часов после инициации антибактериальной терапии широкого спектра действия, с целью исключения ИМ, показано проведение радиологической диагностики: КТ легких и областей, подозрительных на возможную локализацию инфекции, КТ придаточных пазух у детей ≥ 2 лет [46].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последние десятилетия произошли значимые изменения в эпидемиологии ИМ, достигнут прогресс в диагностике и расширен спектр медикаментозного лечения. Несмотря на это, заболеваемость и летальность пациентов остаются на высоком уровне, что в том числе обусловлено отсутствием настороженности специалистов в отношении ИК, неадекватной диагностикой и неверной антифунгальной терапией.

При анализе литературных данных установлено недостаточное количество исследований ИК у детей с онкологическими заболеваниями. Следует подчеркнуть необходимость проведения отечественных исследований с целью получения надежных эпидемиологических сведений ИК в педиатрии, а также совершенствования рекомендаций по диагностике и лечению ИК у данной популяции пациентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Климко Н.Н. Микозы: диагностика и лечение. Руководство для врачей. 3-е изд. перераб. и доп. – М: Фармтек, 2017: 272 с. [Klimko N.N. Mikozy: diagnostika i lechenie. Rukovodstvo dlya vrachej. 3-e izd. pererab. i dop. – М: Farmtek, 2017: 272 s. (In Russ)].
2. Steinbach W. Pediatric invasive candidiasis: epidemiology and diagnosis in children. Journal of Fungi. 2016; 2 (5): 1-9.
3. Rosen G., Nielsen K., Glenn S., et al. Invasive fungal infections in pediatric oncology patients: 11-year experience at a single institution. J. Pediatr. Hematol. Oncol. 2005; 27: 135-140.
4. Krcmery V., Laho L., Huttova M., et al. Aetiology, antifungal susceptibility, risk factors and outcome in 201 fungaemic children: data from a 12-year prospective national study from Slovakia. J. Med. Microbiol. 2002; 51: 110-116.
5. Веселов А.В., Козлов Р.С. Инвазивный кандидоз: современные аспекты эпидемиологии, диагностики, терапии и профилактики у различных категорий пациентов (в вопросах и ответах). Клинический микробиол. Антимикроб. химиотер. 2016; 18 (2): 1-104. [Veselov A.V., Kozlov R.S. Invazivnyj kandidoz: sovremennye aspekty ehpidemiologii, diagnostiki, terapii i profilaktiki u razlichnyh kategorij pacientov (v voprosah i otvetah). Klin mikrobiol. Antimikrob. himioter. 2016; 18 (2): 1-104 (In Russ)].
6. Zaoutis T.E., Argon J., Chu J., et al. The epidemiology and attributable outcomes of candidemia in adults and children hospitalized

- in the United States: A propensity analysis. *Clin. Infect. Dis.* 2005; 41: 1232-1239.
7. Blyth C.C., Chen S.C., Slavin M.A. Not just little adults: Candidemia epidemiology, molecular characterization, and antifungal susceptibility in neonatal and pediatric patients. *Pediatrics* 2009; 123: 1360-1368.
 8. Hartel C., Deuster M., Lehrnbecher T., et al. Review: Current approaches for risk stratification of infectious complications in pediatric oncology. *Pediatr. Blood Cancer.* 2007; 49: 767-773.
 9. Pappas P., Kauffman C., Andes D. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 update by the infectious diseases society of america. *Clin. Infect. Dis.* 2016; 62(4): 1-50.
 10. Zaoutis T.E., Prasad P.A., Localio A.R., et al. Risk factors and predictors for candidemia in pediatric intensive care unit patients: Implications for prevention. *Clin. Infect. Dis.* 2010; 51: e38-e45.
 11. Pasqualotto A.C., de Moraes A.B., Zanini R.R. Analysis of independent risk factors for death among pediatric patients with candidemia and central venous catheter in place. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2007; 28: 799-804.
 12. Girmenia C., Finolezzi E., Federico V., et al. Invasive *Candida* infections in patients with hematological malignancies and hematopoietic stem cell transplant recipients: current epidemiology and therapeutic options. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* 2011; 3.
 13. Zilberberg M., Shorr A., Kollef M. Secular trends in candidemia-related hospitalization in the United States, 2000-2005. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 2008; 29 (10): 978-80.
 14. Groll A., Castagnola E., Cesaro S., et al. Fourth European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL-4): guidelines for diagnosis, prevention, and treatment of invasive fungal diseases in pediatric patients with cancer or allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation. *Lancet. Oncol.* 2014; 15: e327-40.
 15. Dvorak C.C., Fisher B.T., Sung L., et al. Antifungal prophylaxis in pediatric hematology/oncology: new choices and new data. *Pediatr. Blood Cancer.* 2012; 59: 21-26.
 16. Zirkel J., Klinker H., Kuhn A., et al. Epidemiology of *Candida* blood stream infections in patients with hematological malignancies or solid tumors. *Medical Mycology*, 2012; 50: 50-55.
 17. Pagano L., Cairra M., Candoni A., et al. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Haematologica.* 2006; 91:1068-75.
 18. Tragiannidis A., Fegeler W., Rellensmann G., et al. Candidaemia in a European Pediatric University Hospital: a 10-year observational study. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012; 18: E27-E30.
 19. Lehrnbecher T., Varwig D., Kaiser J., et al. Infectious complications in pediatric acute myeloid leukemia: analysis of the prospective multi-institutional clinical trial AML-BFM 93. *Leukemia.* 2004; 18:72-7.
 20. Bochennek K., Hassler A., Perner C., et al. Infectious complications in children with acute myeloid leukemia: decreased mortality in multicenter trial AML-BFM 2004. *Blood Cancer. J.* 2016; 6: 382.
 21. Pana Z., Roilides E., Warris A., et al. Epidemiology of invasive fungal disease in children. *Epidemiology of IFD in children. JPIDS.* 2017; 6 (1): 3-11.
 22. Sung L., Lange B., Gerbing R., et al. Microbiologically documented infections and infection-related mortality in children with acute myeloid leukemia. *Blood.* 2007; 110 (10): 3532-3539.
 23. Ducassou S., Rivaud D., Auvrignon A., et al. Invasive fungal infections in pediatric acute myelogenous leukemia. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2015; 34: 1262-4.
 24. Lehrnbecher T., Ethier M.C., Zaoutis T., et al. International variations in infection supportive care practices for paediatric patients with acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* 2009; 147:125-8.
 25. Zirkel J., Klinker H., Kuhn A., et al. Epidemiology of *Candida* blood stream infections in patients with hematological malignancies or solid tumors. *Medical Mycology.* 2012; 50: 50-55.
 26. Sipsas N.V., Lewis R.E., Tarrand J., et al. Candidemia in patients with hematologic malignancies in the era of new antifungal agents (2001-2007): stable incidence but changing epidemiology of a still frequently lethal infection. *Cancer.* 2009; 115: 4745-52.
 27. Lortholary O., Renaudat C., Sitbon K., et al. The risk and clinical outcome of candidemia depending on underlying malignancy. *Intensive Care Med.* 2017; 43: 652-662.
 28. Chow J.K., Golan Y., Ruthazer R., et al. Factors associated with candidemia caused by non-albicans *Candida* species versus *Candida albicans* in the intensive care unit. *Clin. Infect. Dis.* 2008; 46: 1206-1213.
 29. Mor M., Gilad G., Kornreich L., et al. Invasive fungal infections in pediatric oncology. *Pediatr. Blood Cancer.* 2011; 56: 1092-1097.
 30. Nucci M., Anaissie E. Should vascular catheters be removed from all patients with candidemia? An evidence-based review. *Vascular Catheters and Candidemia.* 2002; 34 (1): 591-599.
 31. van der Waaij D. Colonization resistance of the digestive tract: clinical consequences and implications. *J Antimicrob. Chemother.* 1982; 10 (4): 263-270.
 32. Fleming S., Yannakou C., Haeusler C., et al. Consensus guidelines for antifungal prophylaxis in hematological malignancy and haemopoietic stem cell transplantation. *Intern. Med. J.* 2014; 44 (12b): 1283-1297.
 33. Werba B., Hobbie W., Kazak A., et al. Classifying the intensity of pediatric cancer treatment protocols: the intensity of treatment rating scale 2.0 (ITR-2). *Pediatr. Blood Cancer.* 2007; 48: 673-677.
 34. Garey K.W., Rege M., Pai M.P., et al. Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: A multi-institutional study. *Clin. Infect. Dis.* 2006; 43: 25-31.
 35. Morrell M., Fraser V.J., Kollef M.H. Delaying the empiric treatment of *Candida* bloodstream infection until positive blood cultures results are obtained: A potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 49: 3640-3365.
 36. Pauwa B., Walsh T., Donnelly J., et al. Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis.* 2008; 46 (12): 1813-1821.
 37. Ellepola A., Morrison C. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *J. Microbiol.* 2005; 43: 65-84.
 38. Cuenca-Estrella M., Verweij P.E., Arendrup M.C., et al. ESCMID guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: Diagnostic procedures. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012; 18: 9-18.
 39. Hope W.W., Castagnola E., Groll A., et al. ESCMID guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012:

- Prevention and management of invasive infections in neonates and children caused by *Candida* spp. Clin. Microbiol. Infect. 2012; 18: 38-52.
40. Lecciones J.A., Lee J.W., Navarro E.E., et al. Vascular catheter-associated fungemia in patients with cancer: analysis of 155 episodes. Clin Infect Dis. 1992; 14: 875-83.
 41. Castagnola E., Cesaro S., Giacchino M., et al. Fungal infections in children with cancer. A prospective, multicenter surveillance study. Pediatr. Infect. Dis. J. 2006; 25: 634-639.
 42. Пуримова В.П., Гельфанд М.С. Клиническое значение определения циркулирующего (1 \rightarrow 3)- β -D-глюкана в крови пациентов при подозрении на инвазивную грибковую инфекцию. Онкогематология. 2012; 3: 43-48.
 43. Ascioglu S., Rex J.H., de Pauw B., et al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. Clinical Infectious Diseases 2002; 34:7-14
 44. Mikulska M., Calandra T., Sanguinetti M., et al. The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia. Critical Care. 2010; 14: 1-14.
 45. Salvatore C.M., Chen T.K., Toussi S.S., et al. (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan in cerebrospinal fluid as a biomarker for candida and aspergillus infections of the central nervous system in pediatric patients. J. Pediatric. Infect. Dis. Soc. 2016; 5 (3): 277-86.
 46. Lehrnbecher T., Phillips R., Alexander S., et al. Guideline for the management of fever and neutropenia in children with cancer and/or undergoing hematopoietic stem-cell transplantation. J. Clin. Oncol. 2012; 30: 4427-4438.
 47. Calderone R., Clancy C., et al. *Candida* and candidiasis. Washington: ASM Press; 2012.
 48. Ankras A., Sathekge M., Dierckx R., et al. Imaging fungal infections in children. Clin. Transl. Imaging. 2016; 4: 57-72.

Поступила в редакцию журнала 12.11.2018

Рецензент: Н.Н. Климко



ПЕРВЫЙ СЛУЧАЙ УСПЕШНОГО ЛЕЧЕНИЯ КОКЦИДИОИДОЗА В РОССИИ. ОПИСАНИЕ СЛУЧАЯ И ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Борзова Ю.В. (зав. микологической клиникой, ассистент кафедры)*, Десятник Е.А. (аллерголог-иммунолог), Попова В.В. (студент), Тимирбаева О.Ю. (студент), Богомолова Т.С. (зав. лаб.), Степанова А.А. (зав. лаб.), Климко Н.Н. (зав. кафедрой), Васильева Н.В. (директор НИИ, зав. кафедрой)

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова: НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина; кафедра медицинской микробиологии; кафедра клинической микологии, аллергологии и иммунологии, Санкт-Петербург, Россия

©Коллектив авторов, 2018

Кокцидиоидоз является эндемичным микозом для Северной, Центральной и Южной Америки. Тем не менее, во многих странах мира ежегодно регистрируют случаи микозов, вызванные эндемичными возбудителями. В статье впервые описан клинический случай кокцидиоидоза, диагностированного в России. В обзоре литературы представлены данные об этиологии, патогенезе и клинических проявлениях заболевания.

Ключевые слова: кокцидиоидоз, *Coccidioides* spp., диморфные грибы

FIRST CASE OF SUCCESSFUL TREATMENT OF COCCIDIOIDOMYCOSIS IN RUSSIA. CASE REPORT AND REVIEW

Borzova Yu.V. (head of the mycological clinic, assistant professor of the department), Desyatnik E.A. (allergologist-immunologist), Popova V.V. (student), Timirbaeva O.Y. (student), Bogomolova T.S. (head of the laboratory), Stepanova A.A. (head of the laboratory), Klimko N.N. (head of the department), Vasilyeva N.V. (director of the institute, head of the department)

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov; Kashkin Research Institute of Medical Mycology; Department of Medical Microbiology; Department of Clinical Mycology, Allergology and Immunology, St. Petersburg, Russia

©Collective of authors, 2018

Coccidioidomycosis is an endemic mycosis of North, Central and South America. However, in many countries of the world cases of mycoses caused by endemic fungi are registered annually. First clinical case of coccidioidomycosis diagnosed in Russia has been described in the article. The literature review presents data on the etiology, pathogenesis and clinical manifestations of the disease.

Key words: coccidioidomycosis, *Coccidioides* spp., dimorphic fungi

Кокцидиоидоз является эндемичным микозом в Северной, Центральной и Южной Америке. В результате активизации международного туризма, увеличения миграции населения в последнее десятилетие отмечено увеличение числа случаев выявления кокцидиоидоза в странах Европы [1]. В статье представлен первый клинический случай кокцидиоидоза, диагностированного в России, и обзор литературы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Диагноз кокцидиоидоза установлен по результатам гистологического исследования в соответствии с клиническими и лабораторными критериями, разработанными Европейской организацией по исследованию и лечению рака (EORTC/MSG, 2008) [2]. Пациентке проводили компьютерную томографию (КТ) органов грудной полости (ОГП) в условиях высокого разрешения, выполняли фибробронхоскопию (ФБС) с забором бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) для дальнейшего микологического исследования. Лабораторная диагностика включала микроскопию и посев БАЛ. Мы проанализировали данные научной литературы в базах PubMed за последние 10 лет. При поиске информации использовали следующие ключевые слова: *Coccidioides* spp., coccidioidomycosis.

Описание клинического случая

Пациентка Л., 67 лет. Заболела остро. В конце ноября 2015 г. (во время нахождения в Норвегии, через 5 дней после возвращения из Калифорнии, США) отмечила увеличение температуры тела до фебрильных цифр, сухой кашель. В декабре 2015 г. обратилась за медицинской помощью. Клинико-рентгенологически выявлена острая внебольничная правосторонняя пневмония, СОЭ – до 200 мм/час. В течение 1 недели получала антибактериальную терапию с положительным эффектом – температура нормализовалась. По возвращении домой в г. Екатеринбург наблюдала появление сыпи на голенях, отеки нижних конечностей, боли в суставах. 14.12.2015 г. проведено рентгенологическое исследование органов грудной полости, диагностирована правосторонняя нижнедолевая пневмония. С декабря 2015 г. по январь 2016 г. находилась на стационарном лечении в городской больнице Екатеринбурга с диагнозом: внебольничная пневмония нижней доли справа, узловатая эритема; активность 2-3; НФС 2. На отделении получала антибактериальную терапию (цефтриаксон, таваник), муколитические препараты. С конца декабря 2015 г. по конец февраля 2016 г. пациентке проводили терапию узловатой эритемы преднизолоном 15 мг в сутки с постепенной отменой. При плановом осмотре на КТ органов грудной полости (ОГП) в мае 2016 г. – в S₇ правого легкого обнаружено образование округлой формы, однородной структуры, с четким, бугристым контуром размером 54x43x44 мм, в S_{8,9,10} субплеврально шаровидные фокусы 6-13 мм. Бронхопультмональные узлы справа, бифуркационные до 12 мм (Рис. 1).

* Контактное лицо: Борзова Юлия Владимировна, e-mail: Yuliya.Borzova@szgmu.ru

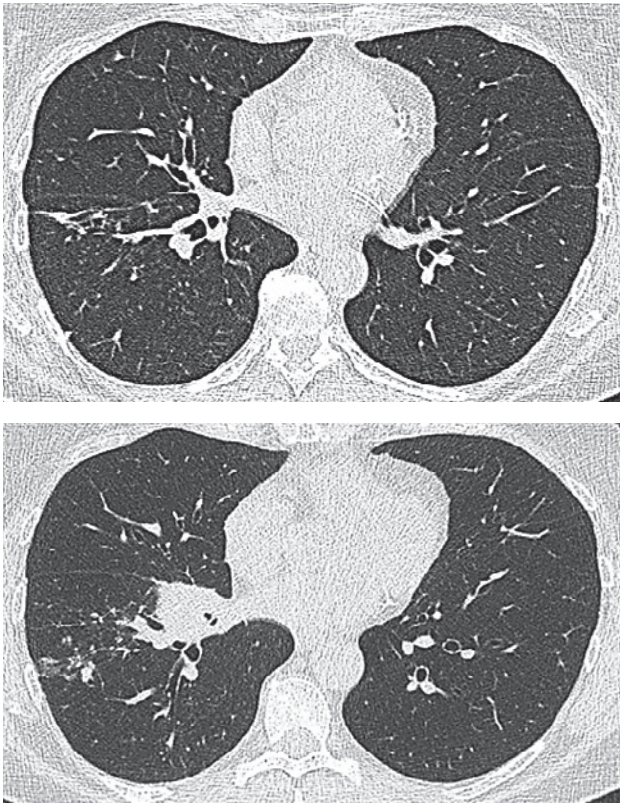


Рис. 1. КТ органов грудной полости от 05.2016 г.

В мае 2016 г. поставлен диагноз «периферический рак 7 сегмента правого легкого». Была выполнена фибробронхоскопия и взят аспират из 7 сегментарного бронха, результат: эпителий слизистой оболочки бронха. 24.05.2016 г. выполнена ПЭТ/КТ – образования правого легкого, внутригрудная лимфаденопатия с повышенной метаболической активностью фтордезоксиглюкозы (ФДГ).

В июне 2016 г. на отделении торакальной хирургии городского онкологического диспансера по месту жительства была выполнена правосторонняя пневмонэктомия с предварительным диагнозом: периферическая неоплазма нижней доли правого легкого с МТС-поражением бронхопульмональных лимфоузлов, T2bN1Mx\ST Ib.

При исследовании послеоперационного материала макроскопически в нижней доле близко к корню наблюдали образование неправильной формы, с нечеткими контурами, размерами 8х6х5 см, светло-серого цвета, плотно-эластической консистенции, а также многочисленные диффузно хаотично расположенные во всех отделах легкого белесоватые эластичные узелки размерами 0,1-0,6 см. При гистологическом исследовании микроскопически: многочисленные близко расположенные фокусы неоднородного некроза с пылевидными и хлопьевидными отложениями солей кальция и очаговой неоднородной инфильтрацией, отграниченные прослойками грануляционной ткани с гигантскими многоядерными клетками Лангханса. Кислотоустойчивые микобактерии (КУМ) при окраске по Цилю-Нильсену не обнаружены (трехкратно с контролем). Проведены дополнительные гистохимические исследования, выявлены ШИК-позитивные сферические образования (сферулы), расположенные внутри- и внеклеточно. Окраска альциановым синим

отрицательная. Заключение: гигантский туберкулоидного типа казеозно-некротический конгломерат в активной фазе процесса. При пересмотре послеоперационного материала в клинике торакальной хирургии Уральского государственного медицинского университета заподозрена грибковая природа поражения: с учетом отсутствия КУМ и выявленных при дополнительных окрасках структур сферической формы предположили хронический кокцидиоидоз легких с преимущественным поражением нижней доли правого легкого с формированием крупного казеозно-некротического фокуса с отграничением, очаговой диссеминацией во всех отделах правого легкого и плевре, продуктивно-некротический кокцидиоидоз всех групп внутригрудных лимфатических узлов на фоне бытового антракониоза. Диагноз туберкулеза маловероятен.

В июле 2016 г. пациентка обратилась в микологическую клинику НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина. На контрольной КТ органов грудной полости в июле 2016 г. в S₅ правого легкого выявлены инфильтративные изменения (Рис. 2).

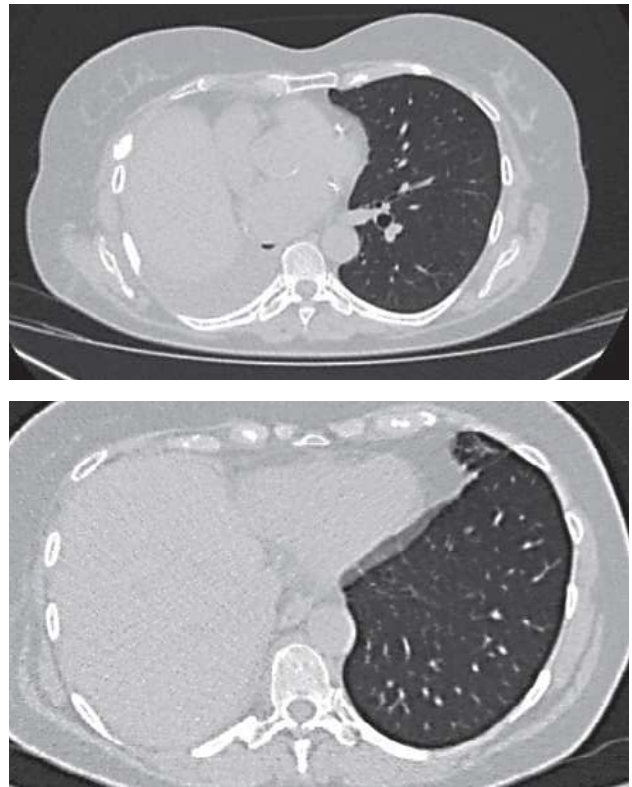


Рис. 2. КТ органов грудной полости от июля 2016 г.

При пересмотре послеоперационного материала в очагах казеозного некроза наблюдали большое количество округлых и овальных форм грибов (сферул), имеющих двойную мембрану и содержащих большое количество эндоспор (Рис. 3).

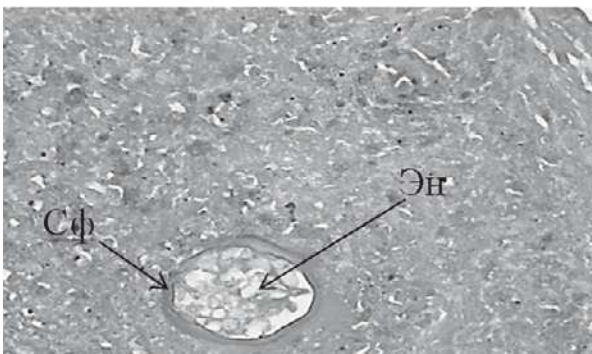
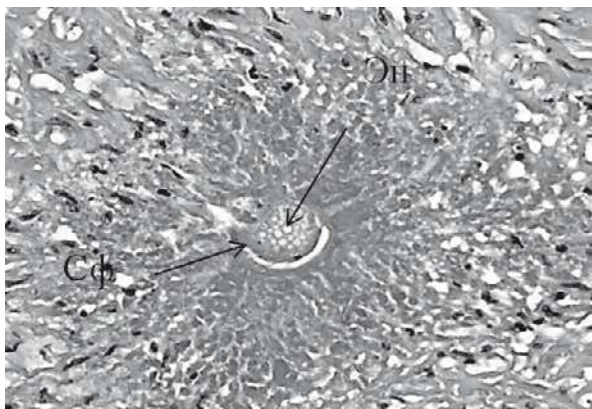


Рис. 3. Микропрепараты нижней доли правого легкого от 15.06.2016. Окраска гематоксилин-эозин. Сферулы с эндоспорами указаны стрелками. Сф – сферула, Эн – эндоспоры. Увеличение: 400х.

Сферулы окрашивались позитивно по Гомори-Грокотт и при PAS-реакции (Рис. 4).

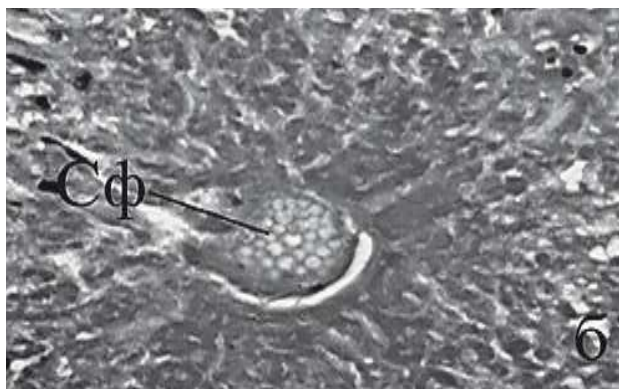
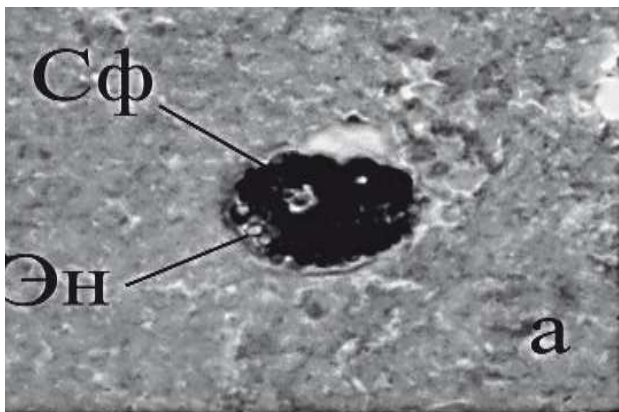


Рис. 4. Микропрепараты нижней доли правого легкого от 15.06.2016 г. Окраска по Гомори-Грокотт (а) и методом PAS-реакции (б). Сф – сферула, Эн – эндоспоры.

На основании обнаружения в ткани легкого характерных сферул с эндоспорами можно заключить, что возбудителем является диморфный гриб *Coccidioides immitis*. Пациентке была рекомендована антимикотическая терапия препаратом итраконазол в стандартных дозировках. В течение 4 месяцев получала итраконазол (орунгал) в дозе 400 мг в сутки.

На КТ ОГП от 09.11.2016 г. инфильтративных изменений в левом легком не выявлено. Сохраняются прежние немногочисленные очаги разной плотности: в S₃ – 3 мм, в S₆ – субплевральный 3 мм и паравазальные 4 мм и 3 мм, в S₉ – 3 мм и 4 мм, в S₁₀ – субплевральный 4 мм. Увеличенных лимфатических узлов не наблюдали. Жидкости в левой плевральной полости не обнаружено (Рис. 5).

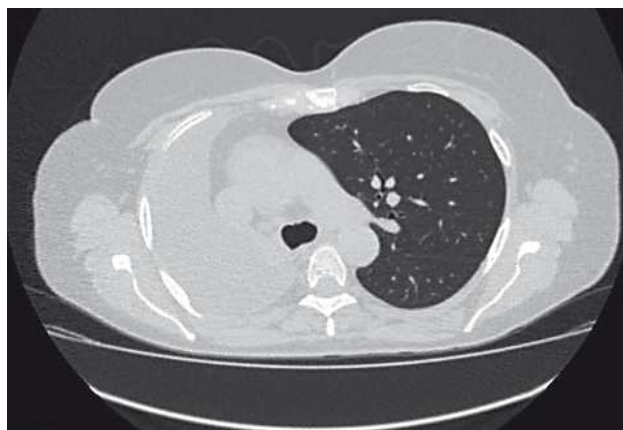


Рис. 5. КТ органов грудной полости от 09.11.2016 г.

Диагностирована ремиссия заболевания. Антимикотическая терапия отменена. Пациентка выписана в удовлетворительном состоянии под наблюдение терапевта по месту жительства и с последующим контрольным обследованием в микологической клинике НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина через 6 месяцев.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Грибы рода *Coccidioides* являются диморфными, относятся к семейству *Onygenaceae*. Распространены в некоторых штатах США (Аризона, Калифорния, Нью-Мексико, Невада, Юта, Вашингтон), а также в Мексике и некоторых районах в Гватемале, Гондурасе, Венесуэле, Бразилии, Аргентине и Парагвае. Естественным резервуаром микромицета в природе считается почва (преимущественно в местностях с жарким сухим летом и дождливой зимой, со скудной растительностью,

где почва легко подвергается эрозии). В сезон дождей грибы вегетируют с образованием артроспор, которые в сухой сезон поднимаются с пылью [3, 4]. *Coccidioides* spp. обладают температурно-зависимым диморфизмом. Опасной является мицелиальная форма, в которой гриб существует в природных условиях в почве, а также растет на агаризованной питательной среде Сабуро при температуре не выше 30 °С [4]. Мицелиальные колонии описывают как плоские, вначале бархатистопушистые, позже мучнистые, серовато-белого цвета, с желтовато-коричневой обратной стороной. Поверхность колонии иногда концентрически исчерчена. При микроскопии наблюдают септированный, ветвящийся мицелий 2-4 мкм в диаметре, многочисленные прямоугольные артроспоры 3-4 мкм в диаметре. Иногда обнаруживают округлые хламидоспоры. Работу с биоматериалом больных кокцидиоидозом и культурами грибов проводят в соответствии с требованиями СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)» [5]. В тканях млекопитающих возбудители кокцидиоидоза существуют почти исключительно в качестве характерных толстостенных сферул с эндоспорами диаметром от 10 до 200 мкм. Стенка сферулы достаточно плотная, при ее разрыве эндоспоры попадают в окружающие ткани, где из спор образуются трофоциты – округлые клетки от 10 до 20 и более мкм, содержащие центральную вакуоль, заполненную гликогеном. Трофоциты трансформируются в сферулы, заполненные эндоспорами [5].

Первый случай кокцидиоидоза был зафиксирован в 1892 г. в Южной Америке у аргентинского солдата. Заболевание протекало преимущественно с кожными проявлениями. При исследовании биоптата пораженного участка обнаружили микроорганизмы, внешне напоминающие одноклеточных паразитов рода *Coccidia*. Два года спустя в Соединенных Штатах (Калифорния) был зафиксирован еще один случай кокцидиоидоза. В 1896 г. ученые E. Rixford и T. Gilchrist сообщили о нескольких случаях заболевания и дали возбудителю имя *Coccidioides* («напоминающий кокцидий») *immitis* («беспощадный») [4].

Основные возбудители кокцидиоидоза у человека – *C. immitis* и *C. posadasii*. В США ежегодная заболеваемость составляет 42,6 на 100000 [6]. На территории нашей страны в настоящее время отсутствуют официальные данные о регистрации особо опасных микозов. В отечественной литературе нет описания клинических случаев кокцидиоидоза в России.

Кокцидиоидозом чаще болеют люди в эндемичных районах, занятые в сфере строительства и сельского хозяйства, а также заключенные и офицеры исправительных учреждений, при этом наибольшее количество заболевших приходится на сезоны с пыльными бурями. Причина такой структуры заболеваемости связана с вдыханием большого количества артроспор возбудителя. Увеличение числа зараженных может быть связано с изменениями условий окружающей среды, деятельностью человека в эндемичных районах, наличием новых методов диагностики, увеличением числа людей с ослабленным иммунитетом и даже повышением чувствительности диагностических тестов. Кокцидиоидоз чаще встречается у женщин в третьем триместре беременности или сразу после родов. Суще-

ствует также более высокий относительный риск распространения заболевания среди афроамериканцев и филиппинцев. Смертность от кокцидиоидоза выше среди лиц старше 65 лет, среди мужчин, коренных американцев и латиноамериканцев, а также среди людей с такими состояниями, как васкулиты, ревматоидный артрит, системная красная волчанка, ВИЧ-инфекция, туберкулез, сахарный диабет, хроническая обструктивная болезнь легких и неходжкинская лимфома [4, 6].

После ингаляции спор *Coccidioides* spp. в 60% случаев инфекция протекает бессимптомно, у остальных развивается пневмония. Приблизительно у 1% инфицированных людей развивается диссеминированное заболевание с поражением кожи, суставов, костей, центральной нервной системы и других органов [7].

Клинические признаки кокцидиоидоза неспецифичны, основными проявлениями пневмонии являются лихорадка и дыхательная недостаточность. Приблизительно у 5% пациентов первичные легочные инфильтраты могут разрешаться с формированием полостей. Первичный легочный кокцидиоидоз может сопровождаться проявлениями узловой эритемы на нижних конечностях. У иммунокомпетентных пациентов первичный легочный кокцидиоидоз, как правило, разрешается самостоятельно без применения специфической терапии и проходит под маской бактериальной или вирусной пневмонии. У иммунокомпрометированных больных заболевание прогрессирует. Раннюю диагностику пневмонии, обусловленной *Coccidioides* spp., осуществляют на основании изменений, выявленных рентгенологически или по данным компьютерной томографии органов грудной полости. Рентгенологически, как правило, определяются очаговые или диффузные инфильтраты с лимфаденопатией [7]. Очень часто полученные изменения трактуют как злокачественные опухоли, при этом ПЭТ/КТ не всегда позволяет дифференцировать злокачественные новообразования от кокцидиоидоза легких, что требует обязательного гистологического подтверждения диагноза [2].

В описанном нами клиническом случае кокцидиоидоз диагностирован несвоевременно. На первом этапе заболевания, на основании клиничко-рентгенологических данных, у больной диагностировали внебольничную пневмонию неясной этиологии.

Случай иллюстрирует важность подробного сбора анамнеза и точной истории путешествий, особенно у пациентов с необычными инфекциями. Хотя пациентка сообщила, что отдыхала в Калифорнии (США) накануне заболевания, диагноз необычной грибковой инфекции стал очевидным только после гистологического исследования операционного материала.

Характерную для кокцидиоидоза узловатую эритему нижних конечностей трактовали как самостоятельное заболевание, в терапии которого использовали системные кортикостероиды. Иммуносупрессия, обусловленная системными глюкокортикостероидами (ГКС), привела к формированию инфильтрата S₇ правого легкого с очагами в S_{8,9,10} и поражением бронхопульмональных и бифукарционных лимфоузлов. Данные ПЭТ/КТ – образования правого легкого, внутригрудная лимфаденопатия с повышенной метаболической активностью ФДГ были расценены как рак

легкого. В связи с онконастороженностью пациентке была проведена правосторонняя пульмонэктомия. Диагноз кокцидиоидоза удалось установить только при гистологическом исследовании биопсийного материала с применением специфической окраски: в материале выявили большое количество округлых и овальных форм грибов (сферул), окрашивающихся позитивно PAS-методом и по Гомори-Грокотт, имеющих двойную мембрану и содержащих большое количество эндоспор (Рис. 3 и 4).

При первичном легочном кокцидиоидозе у иммунокомпетентных больных антимикотическая терапия не показана. Лечение антимикотиками проводят при иммуносупрессии, сахарном диабете, беременности, прогрессировании клинических и рентгенологических признаков инфекции. Препаратом выбора является итраконазол, альтернативные препараты – вориконазол, флуконазол, позаконазол [8, 9]. В случае формирования полостей деструкции, развития осложнений в виде гидроторакса, эмпиемы противогрибковую терапию необходимо проводить наряду с резекцией легкого.

Во всех случаях тяжелого, диссеминированного или рефрактерного кокцидиоидоза препаратом выбора является амфотерицин В или его липидный комплекс. Инфузии амфотерицина В сопровождаются выраженной токсичностью [9].

В описанном случае пациентка получила курс антимикотической терапии итраконазолом в дозе 400 мг в сутки в течение 4 месяцев, в результате чего была достигнута положительная клиническая и рентгенологическая динамика. Диагностирована ремиссия кокцидиоидоза, которая сохраняется до настоящего времени, и отменена антимикотическая терапия.

Ранняя диагностика кокцидиоидоза является трудной задачей ввиду отсутствия настороженности по отношению к эндемичным инфекциям. Клиническая картина и КТ-признаки неспецифичны. При появлении признаков инфекции у пациентов, приехавших из эндемичных регионов, необходимо своевременно выполнять гистологическое исследование биопсийного материала с целью ранней диагностики особо опасных микозов.

ЛИТЕРАТУРА

1. <http://www.ecmm.eu/content/survey-coccidioidomycosis>
2. De Pauw B., Walsh J., Donnelly J.P., et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group / CID. 2008; 46: 1813-1821.
3. Hector R.F., Laniado-Laborin R. Coccidioidomycosis – a fungal disease of the Americas. PLoS Med. 2005..
4. Brown et al. Coccidioidomycosis: epidemiology. Clinical Epidemiology. 2013; (5): 185-197.
5. Аравийский Р.А., Климко Н.Н., Васильева Н.В. Диагностика микозов. Пособие для врачей. СПб. 2004: 185с. [Aravijskij R.A., Klimko N.N., Vasil'eva N.V. Diagnostika mikofov. Posobie dlya vrachej. SPb. 2004: 185s. (In Russ)]
6. Frieden T.R., Jaffe H.W., Stephens J.W., et al. Increase in reported Coccidioidomycosis – United States, 1998-2011. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). MMWR Morb. Mortal Wkly Rep. 2013; 62: 217.
7. Stockamp N.W. & Thompson G.R. Coccidioidomycosis. Infectious Disease Clinics of North America. 2016; 30 (1): 229-246.
8. Климко Н.Н. Микозы: Диагностика и лечение. Руководство для врачей. 3-е изд. М.: Фармтек, 2017: 272 с. [Klimko N.N. Mikozy: Diagnostika i lechenie. Rukovodstvo dlya vrachej. 3-e izd. M.: Farmtek, 2017: 272 s. (In Russ)].
9. Nguyen C., Barker B.M., Hoover S., et al. Recent advances in our understanding of the environmental, epidemiological, immunological and clinical dimensions of coccidiomycosis. Clin. Microbiol. Rev. 2013; 26: 505.

Поступила в редакцию журнала 24.12.2018

Рецензент: В.С. Митрофанов



ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ТЕСТА АКТИВАЦИИ БАЗОФИЛОВ В ВЫЯВЛЕНИИ АЛЛЕРГИЧЕСКОГО БРОНХОЛЕГОЧНОГО АСПЕРГИЛЛЕЗА У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

¹Козлова Я.И. (доцент кафедры)*, ²Фролова Е.В. (зав. лаб.), ²Учеваткина А.Е. (с.н.с.), ²Филиппова Л.В. (с.н.с.), ²Митрофанов В.С. (зав. отделением), ²Аак О.В. (в.н.с.), ²Соловьева Г.И. (в.н.с.), ¹Кузнецов В.Д. (ординатор), ²Васильева Н.В. (директор НИИ, зав. кафедрой), ¹Климко Н.Н. (зав. кафедрой)

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова: ¹ кафедра клинической микологии, аллергологии и иммунологии, ² НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, Санкт-Петербург, Россия

© Коллектив авторов, 2018

Aspergillus spp. – один из основных источников грибковых аллергенов как в окружающей среде, так и внутри жилых и производственных помещений. Клинические проявления гиперчувствительности к *Aspergillus spp.* у больных с atopией могут варьировать от обострения бронхиальной астмы до развития аллергического бронхолегочного аспергиллеза (АБЛА). Достоверное определение микогенной сенсибилизации чрезвычайно важно для установления диагноза АБЛА и назначения адекватной терапии. Существующие методы *in vivo* диагностики микогенной сенсибилизации – кожные и провокационные пробы с грибковыми аллергенами не всегда обладают достаточной надежностью результатов, при этом провокационные пробы могут привести к опасному осложнению в виде анафилактического шока. Поэтому в последнее время большое внимание уделяют *in vitro* методам, преимуществом которых является безопасность для пациента, специфичность и возможность стандартизации. В статье описано применение теста активации базофилов с аллергеном *A. fumigatus* в условиях *in vitro* с использованием проточной цитометрии для выявления АБЛА у больных бронхиальной астмой.

Ключевые слова: тест активации базофилов, *Aspergillus spp.*, *Aspergillus fumigatus*, аллергический бронхолегочный аспергиллез, бронхиальная астма

DIAGNOSTIC POSSIBILITIES OF BASOPHIL ACTIVATION TEST IN THE IDENTIFICATION OF ALLERGIC BRONCHOPULMONARY ASPERGILLOSIS IN PATIENTS WITH ASTHMA

¹Kozlova Y.I. (associate professor), ²Frolova E.V. (head of the laboratory), ²Uchevatkina A.E. (senior scientific collaborator), ²Filippova L.V. (senior scientific collaborator), ²Mitrofanov V.S. (head of the clinical department), ²Aak O.V. (leading scientific collaborator), ²Solovyova G.I. (leading scientific collaborator), ¹Kuznetsov V.D. (hospital physician),

* Контактное лицо: Козлова Яна Игоревна, e-mail: Yana.kozlova@szgmu.ru

²Vasilyeva N.V. (director of the Institute, head of the department), ¹Klimko N.N. (head of the department)

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov: ¹ Department of Clinical Mycology, Allergology and Immunology, ²Kashkin Research Institute of Medical Mycology, St. Petersburg, Russia

© Collective of authors, 2018

Aspergillus spp. is one of the main sources of fungal allergens in the environment, as well as in residential and industrial premises. Clinical manifestations of hypersensitivity to *Aspergillus spp.* in patients with atopy may vary from acute asthma to the development of allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA). A reliable definition of fungus sensitization is extremely important for establishing the diagnosis of ABPA and prescribing adequate therapy. Existing methods of *in vivo* diagnosis of fungus sensitization – skin and provocative tests with fungal allergens do not always have sufficient reliability of the results, while provocative tests can lead to a dangerous complication in the form of anaphylactic shock. Therefore, in recent years a lot of attention is paid to *in vitro* methods, the advantage of which is the safety for the patient, specificity and the possibility of standardization. Use of a basophil activation test with an *A. fumigatus* allergen *in vitro* using flow cytometry to detect ABPA in patients with bronchial asthma have been described in the article.

Key words: basophil activation test, *Aspergillus spp.*, *Aspergillus fumigatus*, allergic bronchopulmonary aspergillosis, bronchial asthma

ВВЕДЕНИЕ

Аллергический бронхолегочный аспергиллез – тяжелое заболевание легких, вызванное гиперчувствительностью к антигенам *Aspergillus spp.*, которое характеризуется плохо контролируемым течением фоновой патологии и развитием дыхательной недостаточности. Наиболее часто АБЛА осложняет течение бронхиальной астмы и муковисцидоза [1, 2]. Для больных из этих групп характерны нарушения защитных механизмов слизистых оболочек дыхательных путей, в том числе дефекты мукоцилиарного клиренса и функции эпителиальных клеток [3, 4]. АБЛА впервые описали К. Hinson и соавторами в 1952 году. С тех пор выявление случаев АБЛА возрастает с каждым годом во всех странах. Кроме того, результаты многочисленных исследований свидетельствуют о высокой частоте микогенной сенсибилизации у больных бронхиальной астмой. По данным Agarwal R. и соавт., которые провели мета-анализ 21 исследования, у больных бронхиальной астмой частота сенсибилизации к *Aspergillus spp.* составила 28%, а развитие АБЛА – 12,9% [5].

Раннее выявление микогенной сенсибилизации чрезвычайно важно для своевременного установления диагноза АБЛА и назначения адекватной терапии, которая предотвратит прогрессирование поражения легких. Однако в рутинной практике специалисты часто сталкиваются с проблемой подтверждения неясных результатов кожных проб и определения sIgE независимым методом [6]. В настоящее время идет поиск новых тестов, которые позволят выявить патогенетические механизмы аллергии, диагностировать и дифференцировать псевдоаллергические реакции. Одним из наиболее перспективных направлений аллергодиагностики *in vitro* является тест оценки активации базофилов специфическими аллергенами с помощью проточной цитометрии [7-10].

Цель исследования – изучение возможности применения теста активации базофилов с аллергеном *A. fumigatus* в условиях *in vitro* с использованием проточной цитометрии для выявления аллергического бронхолегочного аспергиллеза у больных бронхиальной астмой.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включили 76 больных бронхиальной астмой (БА), медиана возраста – 32 года (от 23 до 78 лет). Использовали клинические, аллергологические, иммунологические и инструментальные методы. Особое внимание уделяли данным анамнеза (первые симптомы заболевания и время их появления, динамика развития, возможный контакт с плесневыми грибами дома или на работе, наличие аллергических реакций, наследственность по атопии, предшествующая терапия и ее эффективность).

Больным проводили кожное тестирование с 6 грибковыми аллергенами: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Candida* («Allergopharma», Германия, разрешение этического комитета СЗГМУ им. И. И. Мечникова от 24.06.2014 г.). С помощью иммуноферментного анализа определяли уровень общего IgE (ООО «Полигност», Россия) и специфических IgE к грибковым, бытовым и эпидермальным аллергенам (панель биотинилированных аллергенов «Алкор Био», Россия) в сыворотке крови.

Кровь для теста активации базофилов забирали натощак из кубитальной вены. В качестве антикоагулянта использовали гепарин. Постановку проб осуществляли в течение 1-2 часов от момента забора крови. Исследование активации базофилов проводили методом проточной цитометрии с помощью набора Allergenicity kit (Cellular Analysis of Allergy, BECKMAN-COULTER). Идентификацию базофилов осуществляли с помощью маркеров CD3-CRTH2+ (CRTH2-хемоаттрактантный рецептор, который присутствует как на Th2, так и на базофилах), а выявление активации базофилов – по увеличению содержания клеток с высокой экспрессией CD203c. Методика теста активации базофилов Allergenicity kit: образцы цельной периферической крови окрашивали тройным коктейлем моноклональных антител CRTH2-FITC/CD203c-PE/CD3-PC7 в присутствии буферного раствора (отрицательный контроль) или моноклональных антител к IgE (положительный контроль), или аллергена *A. fumigatus* в течение 15 минут при 37 °С в темноте. Далее проводили лизис эритроцитов лизирующим фиксирующим реагентом, входящим в набор Allergenicity kit. В каждой пробе оценивали 500 базофилов методом проточной цитометрии в мультипараметрическом протоколе с многоэтапным гейтированием.

Для изучения функции внешнего дыхания использовали спирометрию методом выполнения петли «объем-поток» с компьютерной обработкой результатов исследования. Учитывали следующие показатели: объем форсированного выдоха за первую секунду (ОФВ1), форсированную жизненную емкость легких (ФЖЕЛ). По показаниям выполняли компьютерную томографию (КТ) легких в режиме высокого разрешения.

Уровень контроля симптомов и степень тяжести БА определяли в соответствии с критериями «Глобальной стратегии лечения и профилактики бронхиальной астмы» (GINA, 2016).

При оценке контроля над симптомами БА ориентировались на жалобы, клинические проявления, данные спирометрии с проведением теста на обратимость. Также использовали опросник АСТ (Asthma Control Test), который является краткой и доступной анкетой

и содержит 5 вопросов с 5-балльной оценкой ответов. Сумма 25 баллов означают полный контроль БА, 20-24 – неполный контроль, 19 баллов и меньше – указывает на отсутствие контроля. С помощью АСТ оценивали уровень контроля БА за последние 4 недели.

Для выявления микогенной сенсibilизации использовали критерий, предложенный международными экспертами ISHAM: положительный кожный прик-тест (≥ 3 мм) и/или выявление в сыворотке крови уровня специфического IgE к грибковому аллергену, соответствующего классу 1 и выше ($\geq 0,35$ Ед/мл) [5]. Диагноз АБЛА устанавливали на основании критериев R. Agarwal et al., 2013 г. [6].

Полученные данные обрабатывали с помощью программной системы STATISTICA 10, которые представляли в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей ($Me(Q_{0,25}-Q_{0,75})$). Для оценки различий между независимыми выборками применяли непараметрический критерий Манна-Уитни. Корреляции были проверены с помощью теста Спирмана. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для оценки диагностической значимости индекса стимуляции в выявлении микогенной сенсibilизации использовали ROC-анализ (receiver-operator characteristic) с расчетом площади под кривой. Построение ROC-кривой заключается в расположении на осях X и Y частоты истинно положительных результатов (чувствительность) и ложноположительных результатов (специфичность) для каждой точки разделения. Количественную оценку характеристической кривой проводили, рассчитав площадь под ней (area under ROC curve, AUC).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе исследования больные БА были разделены на следующие группы. Положительные результаты кожного тестирования и уровни sIgE к грибковым аллергенам выше диагностического значения (0,35 МЕ/мл) позволили выявить 17 больных тяжелой бронхиальной астмой с микогенной сенсibilизацией (БАМС). У 39 человек была определена тяжелая бронхиальная астма без микогенной сенсibilизации (БА), у 20 – АБЛА, согласно критериям R. Agarwal et al., 2013 г.

Клинические характеристики групп представлены в таблице 1.

Таблица 1

Характеристика больных бронхиальной астмой

Показатели	АБЛА (n=20) Группа 1	БАМС (n=17) Группа 2	БА (n=39) Группа 3	p
	Me(Q _{0,25} -Q _{0,75})			
Возраст, лет	37,0 (28,5-57,0)	44,0 (30,0-63,0)	52,0 (39,0-65,0)	-
Пол, м/ж	5/15	2/15	14/25	-
ФЖЕЛ, %	90,5 (85,0-97,5)	100,0 (96,0-101,0)	101,0 (88,0-110,0)	p _{1,2} =0,021 p _{1,3} =0,004
ОФВ1, %	64,5 (61,5-71,0)	68,0 (57,0-80,0)	80,0 (58,0-88,0)	p _{1,3} =0,005
Индекс Тиффно, %	72,5 (64,0-87,5)	73,0 (59,0-80,0)	80,0 (68,0-87,0)	
АСТ, баллы	14,5 (11,5-17,5)	15,0 (11,0-20,0)	19,0 (16,0-21,0)	p _{1,3} =0,003 p _{2,3} =0,045

Как видно из приведенных данных, группы не отличались между собой по полу и возрасту. При анализе результатов субъективных и объективных методов оценки контроля бронхиальной астмы выявили, что в группе больных АБЛА течение бронхиальной астмы было самым тяжелым. Об этом свидетельствуют низ-

кий балл 14,5 (11,5-17,5) при заполнении анкеты АСТ, который достоверно отличался от результатов больных БА 19,0 (16,0-21,0), (p=0,003), и худшие показатели функции внешнего дыхания ФЖЕЛ и ОФВ1.

Иммунологические характеристики групп пациентов представлены в таблице 2.

Таблица 2

Иммунологические показатели больных бронхиальной астмой

Показатели	АБЛА (n=20) Группа 1	БАМС (n=17) Группа 2	БА (n=39) Группа 3	p
	Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})			
IgE общий, МЕ/мл	1890,0 (781,0-3095,0)	326,00 (37,0-808,0)	113,00 (34,0-538,0)	p ₁₋₃ =0,000 p ₁₋₂ =0,001
sIgE <i>Aspergillus</i> , МЕ/мл	4,62 (1,40-10,12)	0,04 (0,02-0,50)	0,03 (0,02-0,05)	p ₁₋₂ =0,000 p ₁₋₃ =0,000
Эозинофилы, %	8,0 (5,5-15,5)	5,00 (3,00-8,00)	4,0 (2,00-6,00)	p ₁₋₃ =0,000 p ₁₋₂ =0,029
Эозинофилы, × 10 ⁹ /л	0,52 (0,34-1,10)	0,52 (0,32-1,09)	0,24 (0,16-0,46)	p ₁₋₃ =0,001 p ₁₋₂ =0,015
Спонтанная активация базофилов, %	3,10 (1,50-5,00)	2,60 (1,50-4,60)	3,60 (2,20-5,20)	
Активация базофилов анти-IgE антителами, %	68,40 (54,25-89,45)	52,60 (24,40-74,00)	43,80 (13,20-71,00)	p ₁₋₃ =0,003
Количество базофилов, активированных <i>A. fumigatus</i> , %	81,85 (53,05-93,00)	8,10 (4,70-34,30)	4,30 (2,40-6,00)	p ₁₋₃ =0,000 p ₁₋₂ =0,000 p ₂₋₃ =0,002
Индекс стимуляции	21,56 (18,04-32,21)	4,40 (1,94-16,33)	1,00 (0,84-1,36)	p ₁₋₃ =0,000 p ₁₋₂ =0,001 p ₂₋₃ =0,000

Известно, что у больных АБЛА содержание общего IgE в сыворотке крови может достигать чрезвычайно высоких значений, отражая продолжительную аллергенную стимуляцию гуморального иммунного ответа. В ходе исследования у этой категории пациентов установлено значительное повышение уровня общего IgE 1890,0 (781,0-3095,0) МЕ/мл. В группах сравнения этот показатель был достоверно ниже и составил: у больных БАМС – 326,0 (37,0-808,0) МЕ/мл, (p=0,001), у больных БА – 113,0 (34,0-538,0) МЕ/мл, (p=0,000).

Кроме того, у пациентов с АБЛА абсолютное количество эозинофилов было 0,52 (0,34-1,10) 10⁹/л, а уровень sIgE к *A. fumigatus* – 4,62 (1,40-10,12) МЕ/мл. Эти показатели были достоверно выше по сравнению с данными групп сравнения (p<0,05). Повышение этих показателей подтверждает наличие персистирующего аллергического воспаления за счет активации Th2 типа иммунного ответа при развитии АБЛА.

Клинико-иммунологические данные больных БАМС занимали промежуточное положение между показателями пациентов с БА и АБЛА (табл. 1, 2). Значение АСТ у больных БАМС – 15,0 (11,0-20,0) баллов было статистически значимо ниже, чем в группе лиц с БА (p=0,045), что свидетельствует о более тяжелом течении заболевания. Уровень общего IgE у больных БАМС составил 326,0 (37,0-808,0) МЕ/мл, количество эозинофилов периферической крови – 0,52 (0,32-1,09)10⁹/л. Данные показатели не достигли значений, выявленных у больных АБЛА, но были в 2,3 и 1,3 раза выше, чем у пациентов с тяжелой БА.

Всем включенным в исследование больным провели тест активации базофилов с аллергеном *A. fumigatus* в условиях *in vitro* с использованием проточной цитометрии. Установлено, что спонтанная активация базо-

филов у больных АБЛА и пациентов в группах сравнения не различалась между собой и колебалась в пределах от 0,6 до 8,3%.

Количество активированных аллергеном *A. fumigatus* базофилов у больных АБЛА – 81,85 (53,05-93,00)%. Этот показатель достоверно отличался от значений групп сравнения. Количество сенсibilизированных базофилов у пациентов с БАМС и БА было достоверно меньше – 8,1(4,70-34,30)% и 4,3 (2,40-6,00)%, p=0,000; p=0,000 соответственно.

Надо учитывать, что для оценки уровня активации базофилов по экспрессии CD203c в ответ на инкубацию с аллергеном используют не только определение количества активированных базофилов, но и индекс стимуляции (ИС): отношение процента активированных базофилов в пробе с аллергеном к проценту их спонтанной активации в отрицательном контроле. ИС у больных АБЛА составил 21,56 (18,04-32,21) и был достоверно выше по сравнению с ИС больных БАМС и БА – 4,40 (1,94-16,33) и 1,00 (0,84-1,36), p=0,001, p=0,000 соответственно.

Для оценки диагностической значимости теста активации базофилов в выявлении микогенной сенсibilизации использовали ROC-анализ (receiver-operator characteristic) с расчетом площади под кривой. В нашем исследовании ИС колебался от 0,8 до 86,0 у больных с микогенной сенсibilизацией и от 0,6 до 5,6 – без микогенной сенсibilизации. Площадь под ROC-кривой (AUC) составила 0,940 (95% ДИ 0,884-0,995), чувствительность – 86,1% (95% ДИ 70,5-95,3), а специфичность – 89,7% (95% ДИ 75,8-97,1), (p<0,0001) (Рис.). Это указывает на высокую специфичность и чувствительность метода, а значение ИС более 2,55 является оптимальной диагностической точкой разделения (cut off) для выявления микогенной сенсibilизации с высоким уровнем достоверности у больных БА.

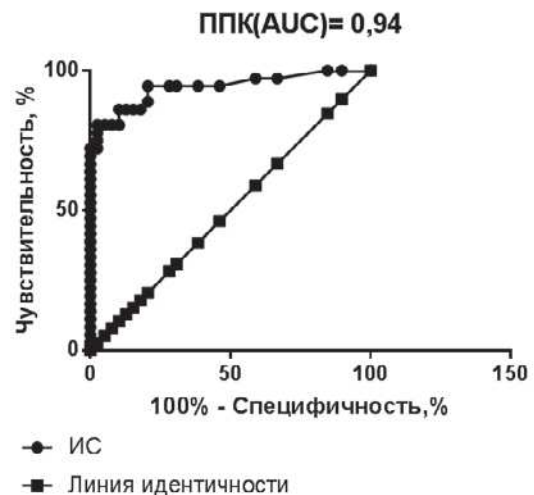


Рис.1. Оценка диагностической значимости теста активации базофилов в выявлении микогенной сенсibilизации с использованием ROC-анализа.

Среди всех лиц с микогенной сенсibilизацией установлена положительная корреляционная связь IgE с процентным и абсолютным числом эозинофилов (r=0,42, r=0,46, p<0,05), уровнем sIgE к *A. fumigatus* (r=0,47, p<0,05), процентом активированных аллергеном *A. fumigatus* базофилов (r=0,41, p<0,05) и ИС (r=0,41, p<0,05), а также обратная корреляционная

связь с ФЖЕЛ ($r=-0,35$, $p<0,05$). Полученные данные подтверждают взаимосвязь гиперчувствительности немедленного типа к грибам рода *Aspergillus* с тяжестью течения бронхиальной астмы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Выявление сенсибилизации к *A. fumigatus* – обязательный критерий в алгоритме диагностики АБЛА у больных БА. Для подтверждения микогенной сенсибилизации мы использовали постановку кожных проб, определение sIgE и тест активации базофилов. В данном исследовании мы сосредоточили внимание на маркере активации базофилов CD203c в качестве индикатора сенсибилизации к *A. fumigatus* и оценили пороговое значение индекса стимуляции.

Базофилы периферической крови и тканевые тучные клетки являются ключевыми эффекторными клетками в реакциях гиперчувствительности немедленного типа. Они участвуют в дифференцировке Т-хелперов 2-го типа (Th2) путем секреции цитокинов и антигенной презентации, что имеет большое значение в развитии IgE-опосредованного хронического аллергического воспаления, и играют ключевую роль в IgG-опосредованной системной анафилаксии [6]. Кроме того, базофилы и тучные клетки могут быть вовлечены и в другие типы аллергического и неаллергического ответов, в основе которых лежат иные механизмы реакции: активация комплемента, не-IgE-опосредованная стимуляция и прямое цитотоксическое (неиммунологическое) воздействие. Таким образом, изучение функциональной активности базофилов имеет важное диагностическое значение [11]. Принцип теста активации базофилов сводится к тому, что при контакте аллергена с молекулами IgE, фиксированных на базофилах, запускается каскад ферментных реакций, приводящих к дегрануляции и появлению на клеточной поверхности дополнительных молекул. К таким молекулам относятся, например, маркер дегрануляции CD63 и активационные молекулы CD203c, CD13, CD107a, CD643. В настоящее время наиболее изученными и перспективными в алергодиагностике маркерами активации базофилов являются CD63 и CD203c [12, 13].

У каждого пациента исследовали спонтанную активацию базофилов – долю клеток CD3-CRTH2+CD203c++ от общего количества базофилов в пробе с буферным раствором, что позволяет разграничить уровень экспрессии молекул покоящихся клеток по сравнению с состоянием активации клетки. Проведение положительного контроля, обеспечивающего неспецифическую активацию базофилов, необходимо для исключения ложноотрицательных реакций и повышения специфичности метода.

Важной особенностью проведения исследования является то, что тест активации базофилов с аллергеном *A. fumigatus* можно выполнять менее чем за 2 часа, используя небольшой объем цельной периферической крови. Это можно сделать в том же образце крови, который используют для других иммунологических исследований, что существенно уменьшает дискомфорт для пациента. Выявление специфических IgE к *A. fumigatus* в сыворотке крови и проведение кожной пробы считают «золотыми стандартами» в рутинном обследовании больных и частью установленных кри-

териев для диагностики АБЛА [1], однако оба этих теста имеют недостатки.

Измерение уровней sIgE к *A. fumigatus* – это легкодоступный тест для врача и удобный для пациента. Однако иммуноглобулины этого класса характеризуются низким содержанием в сыворотке крови, а также могут отсутствовать в циркуляции, но быть фиксированными на клетках-мишенях: базофилах и тучных клетках [6]. В ряде работ показано, что уровни sIgE со временем меняются и должны быть интерпретированы совместно с другими клиническими и лабораторными данными, чтобы установить диагноз [14]. Кроме того, высокий уровень общего IgE у больных может приводить к ложноположительным результатам вследствие неспецифического реагирования с аллергеном.

Диагностика микогенной аллергии *in vivo* подразумевает выполнение кожных проб в виде прик-тестов. К недостаткам кожного тестирования относят риск развития побочных реакций организма на дополнительную антигенную нагрузку, возможность возникновения ложноположительных и ложноотрицательных результатов [15]. Кожные пробы могут быть субъективными для лечащего врача и трудны для интерпретации [16].

Однако как определение sIgE, так и результаты кожных проб показывают лишь наличие сенсибилизации у пациентов, но не всегда клиническую значимость диагностируемого аллергена. В то же время тест активации базофилов является функциональным тестом, который представляет собой провокационную пробу, но выполненную *ex vivo*, в пробирке. Тест активации базофилов является специфической и надежной мерой IgE-зависимого ответа у сенсибилизированных субъектов, потому что базофилы циркулируют в крови, и усиление экспрессии маркеров активации на поверхности базофилов легко оценить с помощью проточной цитометрии.

Таким образом, тест активации базофилов с помощью проточной цитометрии является доступным и перспективным методом для лабораторной диагностики гиперчувствительности немедленного типа. В настоящее время опубликованы данные успешного применения теста активации базофилов для диагностики АБЛА у больных муковисцидозом [17, 18]. Полученные в ходе нашего исследования результаты свидетельствуют, что тест может быть использован в качестве дополнительного метода диагностики АБЛА у больных бронхиальной астмой. Выполнение теста активации базофилов может быть рекомендовано в том случае, когда проведение провокационных исследований связано с риском развития системных реакций, а для постановки кожных проб имеются противопоказания. Изменение уровня активационного маркера базофилов CD203c у больных АБЛА на фоне применения антимикотической и противовоспалительной терапии требует дальнейшего изучения.

ВЫВОДЫ

У больных АБЛА с помощью теста активации базофилов была подтверждена сенсибилизация к *A. fumigatus*.

Установлена положительная корреляционная связь IgE с процентным и абсолютным числом эозинофилов, уровнем sIgE к *A. fumigatus*, процентом активирован-

ных аллергеном *A. fumigatus* базофилов и индексом стимуляции, а также обратная корреляционная связь с ФЖЕЛ.

Тест активации базофилов является перспектив-

ным методом для лабораторной диагностики микогенной аллергии и оценки перестройки иммунного ответа у больных АБЛА на фоне бронхиальной астмы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Agarwal R.A., Chakrabarti A., Shah D., et al. For the ABPA complicating asthma ISHAM working group 2013. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria. *Clinical & Experimental Allergy*. 2013; 43: 850-873.
2. Denning D.W., Pleuvry A., Cole D.C. Global burden of allergic bronchopulmonary aspergillosis with asthma and its complication chronic pulmonary aspergillosis in adults. *Med. Mycol.* 2013; 51: 361-370.
3. Chaudhary N., Datta K., Askin F.B., et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator regulates epithelial cell response to *Aspergillus* and resultant pulmonary inflammation. *J. Respir. Crit. Care Med.* 2012; 185: 301-310.
4. Hogan C., Denning D.W. Allergic bronchopulmonary aspergillosis and related allergic syndromes. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2011; 32: 682-692.
5. Agarwal R., Aggarwal A.N., Gupta, D., et al. *Aspergillus* hypersensitivity and allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with bronchial asthma: Systematic review and meta-analysis. *The international journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2009; 13: 936-944.
6. Karasuyama H., Tsujimura Y., Obata K. et al. Role for basophils in systemic anaphylaxis. *J. Anaphylaxis. Chemical Immunology and Allergy*. 2010; 95: 85-97.
7. Hausmann O.V., Gentinetta T., Bridts C.H., et al. The basophil activation test in immediate-type drug allergy. *Immunology and Allergy Clinics of North America*. 2009; 29: 555-566.
8. Potapińska O., Górska E., Zawadzka-Krajewska A., et al. The usefulness of CD203c expression measurement on basophils after activation with grass pollen and *Dermatophagoides pteronyssinus* antigens. Preliminary study. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2009; 77: 138-144.
9. Peternej A., Eržen R., Bairovič N., et al. Basophil activation test (BAT) in «in vitro» diagnosis of hymenoptera venom hypersensitivity. *Zdravniški Vestnik*. 2008; 77: 183-187.
10. Синельникова Н.А., Бычкова Н.В., Калинина Н.М. Особенности иммунного ответа и активации базофилов у детей с хронической крапивницей. *Медицинская иммунология*. 2015; 17: 39-46. [Sinelnikova N.A., Bychkova N.V., Kalinina N.M. Osobennosti immunnogo otveta i aktivacii ba-zo-filov u detej s hronicheskoj krapivnicej. *Medicinskaya immunologiya*. 2015; 17: 39-46 (In Russ)].
11. Kang M.G., Song W.J., Park H.K., et al. Basophil activation test with food additives in chronic urticaria patients. *Clinical Nutrition Research*. 2014; 3: 9-16.
12. Boumiza R., Debard A.L., Monneret G. The basophil activation test by flow cytometry: recent development in clinical studies, standardization and emerging perspectives. *Clinical and Molecular Allergy*. 2005; 3: 9.
13. Chirumbolo S., Vella A., Ortolani R., et al. Differential response of human basophil activation markers: a multiparameter flow cytometry approach. *Clinical and Molecular Allergy*. 2008; 6: 12.
14. Chirumbolo S. Basophil activation test in allergy: time for an update? *International Archives of Allergy and Immunology*. 2012; 158: 99-114.
15. Oppenheimer J., Nelson H.S. Skin testing. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 2006; 96: 6-12.
16. Chotirmall S.H., Branagan P., Gunaratnam C., et al. *Aspergillus*/allergic bronchopulmonary aspergillosis in an Irish cystic fibrosis population: a diagnostically challenging entity. *Respiratory Care*. 2008; 53: 1035-1041.
17. Mirković B., Lavelle G.M., Abdul Azim A., et al. The basophil surface marker CD203c identifies *Aspergillus* species sensitization in patients with cystic fibrosis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2016; 137: 436-443.
18. Gernez Y., Waters J., Mirković B., et al. Blood basophil activation is a reliable biomarker of allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis. *European Respiratory Journal*. 2016; 47: 177-185.

Поступила в редакцию журнала 11.12.2018

Рецензент: М.А. Шевяков



СТРУКТУРА ГРИБКОВОЙ ИНФЕКЦИИ У БОЛЬНЫХ С ТУБЕРКУЛЕЗОМ, СОЧЕТАННЫМ С ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ, В ЛЕЧЕБНОМ УЧРЕЖДЕНИИ ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ИСПОЛНЕНИЯ НАКАЗАНИЙ

^{1,2}Боровицкий В.С. (врач-фтизиатр, главный специалист научно-инновационного отдела)*, ²Разин М.П. (проректор по научной и инновационной работе), ²Утенкова Е.О. (профессор кафедры), ²Барамзина С. В. (доцент кафедры)

¹Филиал «Туберкулезная больница» ФКУЗ Медико-санитарная часть № 43 ФСИН России, Кирово-Чепецк; ²Кировский государственный медицинский университет (кафедра инфекционных болезней), Киров, Россия

©Коллектив авторов, 2018

Цель работы – выявление структуры поражения грибковой инфекцией у больных с впервые выявленным, с рецидивом, с хроническим течением туберкулеза, сочетанного с ВИЧ-инфекцией в лечебном учреждении Федеральной службы исполнения наказаний (ФСИН).

Провели клиническое обследование 362 мужчин и 1 женщины в возрасте от 19 до 56 (32; 28-37) лет, а также микробиологическое исследование на грибы.

У больных туберкулезом, сочетанным с ВИЧ-инфекцией, находящихся в лечебном учреждении ФСИН, не зависимо от времени развития и длительности течения туберкулеза, часто в качестве вторичной и оппортунистической патологии выявляли микоз (94,3-100%). Наиболее часто диагностировали онихомикоз и кандидозное поражение желудочно-кишечного тракта: соответственно, у 90,1% и 26,0% впервые выявленных больных туберкулезом, у 95,4% и 26,2% – при рецидиве, у 97,2% и 13,9% – при хроническом течении туберкулеза.

Ключевые слова: туберкулез, ВИЧ-инфекция, микоз, Федеральная служба исполнения наказаний

STRUCTURE OF THE FUNGAL INFECTION IN PATIENTS WITH TUBERCULOSIS, COMBINED WITH HIV-INFECTION IN A MEDICAL INSTITUTION OF THE FEDERAL PENITENTIARY SERVICE

^{1,2}Borovitsky V.S. (phthisiatrician, chief specialist of the research and innovation department), ²Razin M.P. (vice-rector for research and innovation work), ²Utenkova Ye.O. (professor of the department), ²Baramzina S.V. (associate professor of the department)

¹Branch «Tuberculosis Hospital» Medical Sanitary Unit №43 of Federal Penitentiary Service of Russia, Kirovo-Chepetsk; ²Kirov

* Контактное лицо: Боровицкий Владислав Семенович, e-mail: qwertyuiop54@yandex.ru

State Medical University (department of Infectious Diseases), Kirov, Russia

©Collective of authors, 2018

The aim of the work was to identify the structure of fungal infection in patients with newly diagnosed, with relapse, with chronic tuberculosis combined with HIV-infection in the medical institution of the Federal Penitentiary Service (FPS).

A clinical examination of 362 men and 1 woman aged 19 to 56 (32; 28-37) years, as well as a microbiological study on fungi were conducted.

In patients with tuberculosis combined with HIV-infection located in the medical institution of FPS, regardless of the time of the development and duration of the course of tuberculosis, often as a secondary and opportunistic pathology was revealed mycosis (94.3-100%). Most often onychomycosis and candidal lesions of the gastro-intestinal tract were diagnosed: therefore, in 90.1% and 26.0% patients with new tuberculosis cases, 95.4% and 26.2% – with relapse, 97.2% and 13.9% – with chronic course of tuberculosis.

Key words: tuberculosis, HIV-infection, mycosis, Federal Penitentiary Service

ВВЕДЕНИЕ

Более 1,6 миллионов людей в мире умирают от микозов ежегодно и около миллиарда – имеют кожное поражение [1]. Коинфекция туберкулез+ВИЧ способствует развитию грибковых инфекций у пациентов, причём коррелирует с более тяжелым течением заболевания [2]. Российских врачей всегда интересовала проблема сочетания туберкулез+микоз [3-5], а также ВИЧ+микоз [6, 7]. Сочетание туберкулез+ВИЧ-инфекция+микоз становится актуальным в последнее время в связи с увеличением встречаемости у больных [8, 9]. Однако на сегодняшний день нам ничего не известно о поражении грибковой инфекцией при сочетании туберкулез+ВИЧ-инфекция в местах лишения свободы.

Цель одноцентрового ретроспективного сплошного исследования – выявление структуры поражения грибковой инфекцией у больных с впервые выявленным, с рецидивом, с хроническим течением туберкулеза, сочетанного с ВИЧ-инфекцией в лечебном учреждении ФСИН.

Статистическая методика. Для статистического анализа набранного клинического материала была подготовлена база данных в табличном процессоре «Excel Microsoft® 2002 (10.2701.2625)». Статистический анализ данных проводили в программах анализа данных: Medcalc® (MedCalc Statistical Software version 17.1, MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2017), OpenEpi версия 2.3 от мая 2009 года, AtteStat, версия 12.5. Все количественные данные проверяли на нормальность распределения с помощью критерия Колмогорова – Смирнова (с поправкой значимости Лиллиефорса). Предположение о нормальности всех количественных показателей было отклонено, поэтому данные представлены в виде: медиана (Me), верхний (75-й перцентиль) и нижний (25-й перцентиль) квартили (LQ-UQ) – (Me; 25-75%) или Me (min, 25-75%, max). Для оценки достоверности различий трёх выборок вычисляли критерий χ^2 для таблиц сопряженности 3x2 для числа степеней свободы $df=2$.

Критическое значение уровня статистической значимости при проверке нулевых гипотез принимается в обычных случаях равным 0,05. В случае превышения достигнутого уровня значимости статистического критерия этой величины принимается нулевая гипотеза. Однако, если в нашем исследовании (см. ниже) три группы, возникает проблема множественных сравне-

ний. При принятии 0,05 за уровень статистической значимости вероятность отсутствия ошибки 1 типа составит 95% (0,95), при проведении в нашем случае трёх сравнений вероятность отсутствия ошибки 1 типа в любом из сравнений составит $0,95^3=0,857375$ или 85,7%. То есть вероятность сделать хотя бы одну ошибку 1 типа будет равна $1-0,95^3=0,142625$ или 14,3% вместо 5%. Таким образом, в нашей работе необходимо использовать меньший критический уровень значимости $P=1-0,95^{1/3}=0,017$.

При анализе результатов применяли 95% доверительный интервал доли (ДИ согласно «Mid-P exact test» Miettinen'a с изменениями от 1974 года по книге: Epidemiologic Analysis with a Programmable Calculator, 1979).

В связи с ненормальностью распределения сравнение непрерывных и порядковых данных проводили (при числе сравниваемых групп – трёх) с использованием непараметрического критерия Краскела-Уоллеса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили в филиале «Туберкулезная больница» ФКУЗ Медико-санитарная часть № 43 ФСИН. Объект изучения – 362 мужчины и одна женщина в возрасте от 19 до 56 (32; 28-37) лет, с индексом массы тела от 15,09 до 28,09 (21,91; 20,21-23,76) с туберкулезом, сочетанным с ВИЧ-инфекцией. Все 363 (100%) человека находились в трудоспособном возрасте (19-56 лет).

Для изучения особенностей грибкового поражения у больных туберкулезом с сочетанной ВИЧ-инфекцией в лечебном учреждении ФСИН пациенты в зависимости от времени обнаружения и течения туберкулеза были разделены на 3 группы:

- первая группа – 262 человека (72,2%) с впервые выявленным туберкулезом;
- вторая группа – 65 человек (17,9%) с рецидивом туберкулеза,
- третья группа – 36 человек (9,9%) с хроническим течением туберкулеза.

Длительность ВИЧ-инфекции с момента обнаружения у больных составила от 2 месяцев до 20 (5; 2-9) лет, курильщиками были 98,6% (358/363) со стажем курения от 1,5 до 41 (20; 15-21) лет, с судимостью от одной до 12-й (3; 2-4), с общим временем пребывания в местах лишения свободы от 4 месяцев до 25 (6; 2,5-10) лет. Уровень РНК ВИЧ составил от отсутствия обнаружения копий РНК ВИЧ до 21 747 862 (56 000; 3 418–295 595 копий в мкл), уровень CD4-лимфоцитов – от $0,002 \cdot 10^9/л$ до $1,59 \cdot 10^9/л$ ($0,303 \cdot 10^9/л$; $0,120-0,484 \cdot 10^9/л$). Уровень гемоглобина при поступлении в стационар варьировал от 65 г/л до 172 г/л (138; 122-148 г/л), эритроцитов – от $2,34 \cdot 10^{12}/л$ до $5,85 \cdot 10^{12}/л$ ($4,42 \cdot 10^{12}/л$; $4,0-4,74 \cdot 10^{12}/л$), лейкоцитов – от $1,6 \cdot 10^9/л$ до $18,6 \cdot 10^9/л$ ($5,4 \cdot 10^9/л$; $4,23-6,8 \cdot 10^9/л$), СОЭ – от 2 до 78 (22; 10,3-40,8) мм/час.

Стадию ВИЧ-инфекции устанавливали на основании клинической классификации в соответствии с Приказом Минздрава России №166 от 17 марта 2006 г. и Национальным руководством «ВИЧ-инфекция и СПИД» от 2014 г. [10].

Согласно действующей в России классификации ВИЧ-инфекции [11], стадия и фаза заболевания устанавливаются только на основании клинических проявлений. Уровень вирусной нагрузки и CD₄-лимфоцитов не является критерием для определения клинической стадии или фазы заболевания. Признаком перехода ВИЧ-инфекции в стадию 4Б может являться туберкулез, ограниченный одной анатомической областью. Стадия 4В характеризуется развитием тяжелых, угрожающих жизни вторичных (оппортунистических) заболеваний, их генерализованным характером, поражением центральной нервной системы. Постановка диагноза «ВИЧ-инфекция, терминальная стадия» не рекомендуется [12].

Мы осуществляли клиническое обследование больного, микроскопическое и микробиологическое исследование с целью обнаружения в отделяемом (или соскобах) грибов, микобактерий туберкулеза (МБТ), рентгенологическое исследование, выполняли клинические анализы крови и мочи.

В таблице 1 представлено распределение больных туберкулезом, сочетанным с ВИЧ-инфекцией, в исследованных группах по стадии ВИЧ-инфекции и приёму антиретровирусной терапии (АРВТ).

Как следует из таблицы 1, наибольшее число пациентов в 4Б стадии ВИЧ-инфекции, не получавших АРВТ, было в 3-й группе – 72,2%, в 1-й и 2-й – 53,1% и 38,5% соответственно со статистически значимым различием между группами.

Длительность ВИЧ-инфекции (min, 25%-75%, max): 1-я группа – 5 (0,2, 2-9, 20), 2-я – 5 (1, 3-11,3, 16), 3-я – 3,5 (1, 1,5-7,16) лет без статистически значимого различия между группами (H-5,3183, P = 0,067929).

Индекс массы тела (min, 25%-75%, max): 1-я группа – 21,96 (15,67, 20,24-23,89, 28,09), 2-я – 21,39 (15,09, 19,57-22,88, 25,47), 3-я – 22,02 (18,2, 20,83-23,57, 27,97) без статистически значимого различия между группами (H-3,7930, P = 0,150082).

Количество судимостей (min, 25%-75%, max): 1-я группа – 3 (1, 1-4, 11), 2-я – 3 (1, 2-5, 12), 3-я – 3 (1, 2-6, 10) со статистически значимым различием между группами (H-17,8143, P = 0,000096), при этом 1-я группа отличалась (P<0,01) от 2-й группы и наоборот.

Длительность пребывания в местах лишения свободы (МЛС) (min, 25%-75%, max): 1-я группа – 4,5 (0,4, 2-8,5, 23), 2-я – 10 (1, 6-15,3, 25), 3-я – 8 (0,5, 4-12, 21) лет со статистически значимым различием между группами (H-42,0883, P < 0,000001), при этом 1-я группа отличалась (P<0,01) от 2-й и 3-й, 2-я – от 1-й и 3-я – от 1-й.

Курильщиками в 1-й группе были 98,5% (258/262)

Таблица 1

Распределение больных туберкулезом, сочетанным с ВИЧ-инфекцией, в исследованных группах по стадии ВИЧ-инфекции и приёму АРВТ

стадия	АРВТ	1-я группа (n=262) %, ДИ доли, (абс.)	2-я группа (n=65) %, ДИ доли, (абс.)	3-я группа (n=36) %, ДИ доли, (абс.)	χ ² ; p для DF=2	всего (n=363) %, ДИ доли, (абс.)
4Б	без АРВТ	53,1% 47,0-59,1% (139)	38,5% 27,3-50,7% (25)	72,2% 56,1-85,0% (26)	10,78; 0,004568	52,3% 47,2-57,5% (190)
	с АРВТ	23,3% 18,5-28,7% (61)	38,5% 27,3-50,7% (25)	16,7% 7,0-31,5% (6)	7,932; 0,01895	25,2% 21,1-30,0% (92)
4В	без АРВТ	10,7% 7,4-14,9% (28)	10,8% 4,8-20,1% (7)	8,3% 2,2-21,0% (3)	0,1947; 0,9072	10,5% 7,6-13,9% (38)
	с АРВТ	13,0% 9,3-17,5% (34)	12,3% 5,9-22,0% (8)	2,8% 0,1-13,0% (1)	3,169; 0,2050	11,8% 8,8-15,5% (43)

человек с длительностью курения 17 лет (1,5, 14-21, 40), во 2-й – 98,5% (64/65) – 21 год (5, 20-30,5, 41), в 3-й – 100% (36/36) – 20 лет (10, 16-24, 39) со статистически значимым различием между группами ($H=30,3383$, $P < 0,000001$), при этом 1-я группа отличалась ($P < 0,01$) от 2-й, а 2-я – от 1-й.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Распределение больных в наблюдаемых группах по наличию грибковой инфекции представлено в таблице 2.

Таблица 2

Распределение больных в наблюдаемых группах по наличию грибковой инфекции

	1-я (n=262)%, (абс.)	2-я (n=65)%, (абс.)	3-я (n=36)%, (абс.)	χ^2 ; p для DF=2
Грибковое поражение	94,3% (247)	98,5% (64)	100% (36)	4,009; 0,135

Как следует из таблицы 2, у наибольшего числа больных в качестве вторичной и оппортунистической патологии диагностировали микоз (94,3-100%).

Распределение пациентов в наблюдаемых группах по структуре грибкового поражения представлено в таблице 3.

Таблица 3

Структура грибкового поражения у исследованных пациентов

Локализация	1-я (n=262)%, (абс.)	2-я (n=65)%, (абс.)	3-я (n=36)%, (абс.)	χ^2 ; p для DF=2
Кандидозное поражение ЖКТ	26,0% (68)	26,2% (17)	13,9% (5)	2,55; 0,280
Кандидозное поражение слизистой оболочки ротоглотки	24,8% (65)	20% (13)	11,1% (4)	3,7; 0,157
Кандидозный баланопитит	1,9% (5)	1,5% (1)	2,8% (1)	0,190; 0,909
Бронхи	11,5% (30)	20% (13)	11,1% (4)	3,497; 0,174

Себорейный дерматит	18,3% (48)	7,7% (5)	11,1% (4)	5,081; 0,079
Онихомикоз	90,1% (236)	95,4% (62)	97,2% (35)	3,522; 0,172
Ногти кисти	1,5% (4)	3,1% (2)	-	1,442; 0,486
Кожа подошв	37,0% (97)	49,2% (32)	22,2% (8)	3,038; 0,219
Кожа ладоней	0,8% (2)	1,5% (1)	-	0,714; 0,670
Кожа паховой области	6,1% (16)	3,1% (2)	8,3% (3)	1,353; 0,508
Волосистая часть головы	16,8% (44)	4,6% (3)	11,1% (4)	6,682; 0,035
Кожа лица	0,8% (2)	1,5% (1)	-	0,714; 0,700
Кожа туловища	8,4% (22)	6,2% (4)	11,1% (4)	0,773; 0,680

Как следует из таблицы 3, у исследованных пациентов в структуре грибкового поражения кожи и/или слизистых оболочек чаще всего диагностировали онихомикоз (90,1-97,2%) без статистически значимого различия между подгруппами. На втором месте – кандидозное поражение ЖКТ (13,9-26,2%). По частоте встречаемости иных локализаций грибковой инфекции различие между подгруппами также статистически не значимо.

ВЫВОДЫ

У больных туберкулезом, сочетанным с ВИЧ-инфекцией, находящихся в лечебном учреждении ФСИН, независимо от времени развития и длительности течения туберкулеза, часто в качестве вторичной и оппортунистической патологии выявляют микоз (94,3-100%). Наиболее часто диагностировали онихомикоз и кандидозное поражение желудочно-кишечного тракта: соответственно, у 90,1% и 26,0% впервые выявленных больных туберкулезом, у 95,4% и 26,2% – при рецидиве, у 97,2% и 13,9% – при хроническом течении туберкулеза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cole D.C., Govender N.P., Chakrabarti A., et al. Improvement of fungal disease identification and management: combined health systems and public health approaches. *Lancet Infect. Dis.* 2017; 17 (12): 412-419.
2. Fang W., Zhang L., Liu J., et al. Tuberculosis/cryptococcosis co-infection in China between 1965 and 2016. *Emerg. Microbes. Infect.* 2017; 6 (8): 73.
3. Оркин В.Ф., Суворов А.П., Завьялов А.И. и др. Микозы у больных туберкулезом. *Успехи медицинской микологии.* 2004; 4: 233. [Orkin V.F., Suvorov A.P., Zav'yalov A.I. i dr. Mikozy u bol'nyh tuberkulezom. *Uspekhi medicinskoj mikologii.* 2004; 4: 233 (In Russ)].
4. Калашникова С.А., Несмиянов П.П. Микозы в специализированном туберкулезном стационаре у больных с туберкулезом лёгких. *Успехи медицинской микологии.* 2014; 13: 249-251. [Kalashnikova S.A., Nesmiyanov P.P. Mikozy u specializirovannom tuberkuleznom stacionare u bol'nyh s tuberkulezom lyogkih. *Uspekhi medicinskoj mikologii.* 2014; 13: 249-251 (In Russ)].
5. Кулько А.Б., Максимова И.А. Риск развития криптококкоза у больных туберкулезом органов дыхания. *Успехи медицинской микологии.* 2016; 15: 24-27. [Kul'ko A.B., Maksimova I.A. Risk razvitiya kriptokokkoza u bol'nyh tuberkulezom organov dyhaniya. *Uspekhi medicinskoj mikologii.* 2016; 15: 24-27 (In Russ)].
6. Ермилов В.В., Смирнов А.В., Редькина Н.А. и др. Генерализованное течение криптококкоза у ВИЧ-инфицированных. *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета.* 2012; 41 (1): 38-40. [Ermirov V.V., Smirnov A.V., Red'kina N.A. i dr. Generalizovannoe techenie kriptokokkoza u VICH-inficirovannyh. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta.* 2012; 41 (1): 38-40 (In Russ)].
7. Корнишева В.Г., Могилёва Е.Ю. Микозы при ВИЧ-инфекции. *Обзор литературы. Проблемы медицинской микологии.* 2013;15 (4): 10-19. [Kornisheva V.G., Mogilyova E.Y. Mikozy pri VICH-infekcii. *Obzor literatury. Problemy medicinskoj mikologii.* 2013;15 (4): 10-19 (In Russ)].
8. Михайловский А.М., Лепеха Л.Н. Глубокие микозы при сочетании туберкулеза и ВИЧ-инфекции (по данным патологоанатомического исследования). *Успехи медицинской микологии.* 2015; 14: 152-155. [Mihajlovskij A.M., Lepexha L.N. Glubokie mikozy pri sochetanii tuberkuleza i VICH-infekcii (po dannym patologoanatomicheskogo issledovaniya). *Uspekhi medicinskoj mikologii.* 2015; 14: 152-155 (In Russ)].
9. Фролова О.П., Белякова Е.Ф., Шаркова Т.И., Казенный А.Б. Микозы у больных ВИЧ-инфекцией в сочетании с туберкулезом, подходы к их выявлению. *Успехи медицинской микологии.* 2016; 16: 17-20. [Frolova O.P., Belyakova E.F., SHarkova

- Т.И., Kazennyj A.B. Mikozy u bol'nyh VICH-infekciej v sochetanii s tuberkulezom, podhody k ih vyavleniyu. Uspekhi medicinskoj mikologii. 2016; 16: 17-20 (In Russ)].
10. ВИЧ-инфекция и СПИД. Национальное руководство / Под редакцией акад. РАН В.В. Покровского. М., 2014: 521 с. [ВИЧ-инфекция i СПИД. Nacional'noe rukovodstvo / Pod redakciej akad. RAN V.V. Pokrovskogo. M., 2014: 521 s. (In Russ)].
 11. Клиническая классификация ВИЧ-инфекции приложение к Инструкции по заполнению годовой формы государственного федерального статистического наблюдения №61 «Сведения о контингентах больных ВИЧ-инфекцией», утверждённой Приказом Минздравсоцразвития России от 17 марта 2006 г. № 166. [Klinicheskaya klassifikaciya VICH-infekcii prilozhenie k Instrukcii po zapolneniyu godovoj formy gosudarstvennogo federal'nogo statisticheskogo nablyudeniya №61 «Svedeniya o kontingentah bol'nyh VICH-infekciej», utverzhdyonnoj Prikazom Minzdravsocrazvitiya Rossii ot 17 marta 2006 g. № 166 (In Russ)].
 12. ВИЧ-инфекция у взрослых. Клинические рекомендации. М., 2017: 64. [ВИЧ-инфекция u vzroslyh. Klinicheskie rekomendacii. M., 2017: 64 (In Russ)].

Поступила в редакцию журнала 14.11.2018

Рецензент: М.В. Шульгина



ХРОНИЧЕСКИЙ АСПЕРГИЛЛЕЗ У ПАЦИЕНТОВ С ДЕСТРУКТИВНЫМ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

^{1,2}Евсеев П.Ю. (аспирант)*, ¹Белоказанцева В. (студентка), ^{1,2}Кондакова М.Н. (профессор кафедры), ¹Елькин А.В. (зав. кафедрой), ³Борзова Ю.В. (зав. микологической клиникой, ассистент кафедры), ³Десятик Е.А. (аллерголог-иммунолог), ³Богомолова Т.С. (зав. лаб.), ³Игнатьева С.И. (в.н.с.), ³Шульгина М.В. (зам. директора по научной работе), ¹Климко Н.Н. (зав. кафедрой)

¹Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова; ²Городской противотуберкулезный диспансер; ³НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, Санкт-Петербург, Россия

©Коллектив авторов, 2018

В статье представлены данные о выявлении хронического аспергиллеза у пациентов с деструктивным туберкулезом легких на базе городского противотуберкулезного диспансера г. Санкт-Петербурга за период с ноября 2016 г. по февраль 2018 г. Установлена высокая частота обсеменения посттуберкулезных полостных изменений в легких микромицетами (32,7%). Наличие множественной и широкой лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза повышает риск развития хронического аспергиллеза легких. Для раннего выявления хронического аспергиллеза легких рационально использовать иммуноферментный анализ (ИФА) крови с определением титра специфического IgG к *Aspergillus* spp.

Ключевые слова: туберкулез, аспергиллез, иммуноферментный анализ крови, антибактериальная терапия

CHRONIC ASPERGILLOSIS IN ADULT PATIENTS WITH CHRONIC DESTRUCTIVE PULMONARY TUBERCULOSIS

^{1,2}Evseev P.Y. (postgraduate student), ¹Belokazanceva V. (student), ^{1,2}Kondakova M.N. (professor of the department), ¹Elkin A.V. (head of the department), ³Borzova Y.V. (head of the mycological clinic, assistant of the department), ³Desyatik E.A. (allergologist-immunologist), ³Bogomolova T.S. (head of the laboratory), ³Ignatieva S.I. (leading scientific collaborator), ³Shulgina M.V. (deputy director for scientific work), ¹Klimko N.N. (head of the department)

¹North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov; ²St. Petersburg city tuberculosis dispensary; ³Kashkin Research Institute of Medical Mycology, St. Petersburg, Russia

©Collective of authors, 2018

Data on the detection of chronic aspergillosis in patients with destructive pulmonary tuberculosis on the basis of the St. Petersburg city TB dispensary for the period from November 2016 to February 2018 have been presented in the article. High frequency (32.7%) of post-tuberculosis cavity changes in the lungs with micromycetes was established. The presence of multiple and broad drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* increases the risk of chronic aspergillosis. For early detection of chronic pulmonary aspergillosis it

* Контактное лицо: Евсеев Павел Юрьевич,
e-mail: evseev.0891@mail.ru

is rational to use enzyme immunoassay (ELISA) of blood with determination of specific IgG titer to *Aspergillus* spp.

Key words: respiratory tuberculosis, pulmonary aspergillosis, enzyme immunoassay, antibiotic therapy

ВВЕДЕНИЕ

Во всем мире отмечают рост числа заболеваний, в патогенезе которых важную роль играют плесневые грибы рода *Aspergillus* [1]. Значительное количество разнообразных факторов (курение, поллютанты, прием ряда лекарственных препаратов), а также длительные воспалительные патологические процессы ведут к повреждению мукоцилиарного клиренса и, как следствие, к задержке выведения спор *Aspergillus*, их контакту с иммунными клетками и развитию сенсибилизации. Нарушения элиминации спор могут привести к вегетации грибов в органах дыхания человека и развитию хронического аспергиллеза легких (ХАЛ). В большинстве исследований выявлено, что основное «фоновое заболевание» у пациентов с ХАЛ – туберкулез органов дыхания, в среднем до 72% всех случаев [2, 3]. Сообщают о возрастающей вероятности развития ХАЛ при наличии полостей в легких диаметром от 2 см и более [4]. В ретроспективном обзоре отдаленных результатов лечения пациентов с кавернозным туберкулезом легких представлены данные о выявлении среди них от 11 до 25% случаев колонизации *Aspergillus* spp. (из них в 11-14% – с рентгенологическими признаками развития ХАЛ) [5]. В нашей стране посвященные данной проблеме исследования не проводили.

Цель исследования – определение частоты хронического аспергиллеза легких у пациентов с деструктивным туберкулезом легких.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

За период с ноября 2016 г. по февраль 2018 г. на базе городского противотуберкулезного диспансера г. Санкт-Петербурга обследовали 52 больных хроническим деструктивным туберкулезом легких, из них: 38 мужчин (73,08%) и 14 женщин (26,92%) в возрасте от 33 до 84 лет (медиана – 51 год). Всем пациентам проводили противотуберкулезную химиотерапию не менее 8 месяцев: 15 (28,85%) – по I режиму, 10 (19,23%) – по II режиму, 8 (15,38%) – по III режиму, 13 (25%) – по IV режиму и 6 (11,54%) – по V режиму. Больные диссеминированным туберкулезом легких составили 30,8%, кавернозным – 17,3%, фиброзно-кавернозным – 40,4%, цирротическим – 11,5%.

Для диагностики ХАЛ применяли критерии Европейского Респираторного Общества [6]. Диагноз устанавливали при типичной рентгенологической картине (МСКТ ОГК – мультиспиральная компьютерная томография органов грудной клетки) в сочетании с подтверждением аспергиллезной инфекции микологическими и/или иммунологическими методами. В качестве микологических методов диагностики использовали прямую микроскопию бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) при фибробронхоскопии (ФБС) для обнаружения септированного мицелия и посев БАЛ на среду Сабуро для выделения грибов рода *Aspergillus*. В качестве серологических методов диагностики выполняли ИФА крови с определением титра специфического IgG к *Aspergillus* spp.; положительным тест считали при обнаружении антител к *Aspergillus* spp. в титре > 1:100.

Пациенты с диагностированным ХАЛ были включены в исследуемую группу: 13 мужчин (76,5%) и 4 женщины (23,5%) в возрасте от 36 до 69 лет (медиана – 56 лет). Остальные 35 пациентов (67,3%) наблюдались в группе контроля: 25 мужчин (71,4%) и 10 женщин (28,6%) в возрасте от 33 до 84 лет (медиана – 51 год). Между больными ХАЛ и контрольной группой достоверных различий по полу ($p=0,42$) и возрасту ($p=0,19$) не было.

Обработку полученных данных выполняли в электронной системе для статистического анализа StatSoft STATISTICA 10. Для количественных показателей использовали методы описательной статистики (среднее значение, стандартное отклонение), качественные показатели оценивали в процентном соотношении. Достоверность различий в полученных результатах выводили с учетом р-критерия.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У всех 52 пациентов, несмотря на наличие деструкции легочной ткани, МБТ в БАЛ не обнаружены. Культуральным методом (посев на среду Сабуро) грибы рода *Aspergillus* выявлены у 17 человек (32,7%); из них: у 9 пациентов (52,9%) наличие септированного мицелия в БАЛ подтверждалось методом прямой микроскопии, у 14 (82,4%) – в сыворотке крови выявлены антитела (IgG) к *Aspergillus* spp. в диагностическом титре ($> 1:100$).

В исследовании ни у одного из включенных пациентов явных рентгенологических признаков формирования мицетом не отмечено; на МСКТ больных исследуемой и контрольной групп отмечали типичные для хронического туберкулеза легких изменения (Рис.): при диссеминированном туберкулезе – очагово-инфильтративные и фиброзные изменения в верхних и средних поясах обоих легких с наличием полостей деструкции (от 0,5 до 4 см); при кавернозном туберкулезе – одиночные тонкостенные каверны (от 1,5 до 6 см) в S_1, S_2, S_4, S_6 обоих легких с очаговыми изменениями в окружающей легочной ткани; при фиброзно-кавернозном туберкулезе – одностороннее или двустороннее уменьшение объемов верхних долей за счет формирования пневмофиброза на фоне очагово-инфильтративных изменений с наличием толстостенных каверн неправильной формы (от 2 до 10 см) и фиброзной деформации корней легких; при цирротическом туберкулезе – от локального (S_1, S_2, S_5, S_8) до субтотального разрушения легкого с замещением легочной ткани участками кистовидной перестройки, тяжистоячеистого пневмофиброза и участками инфильтрации с расширенными бронхами.

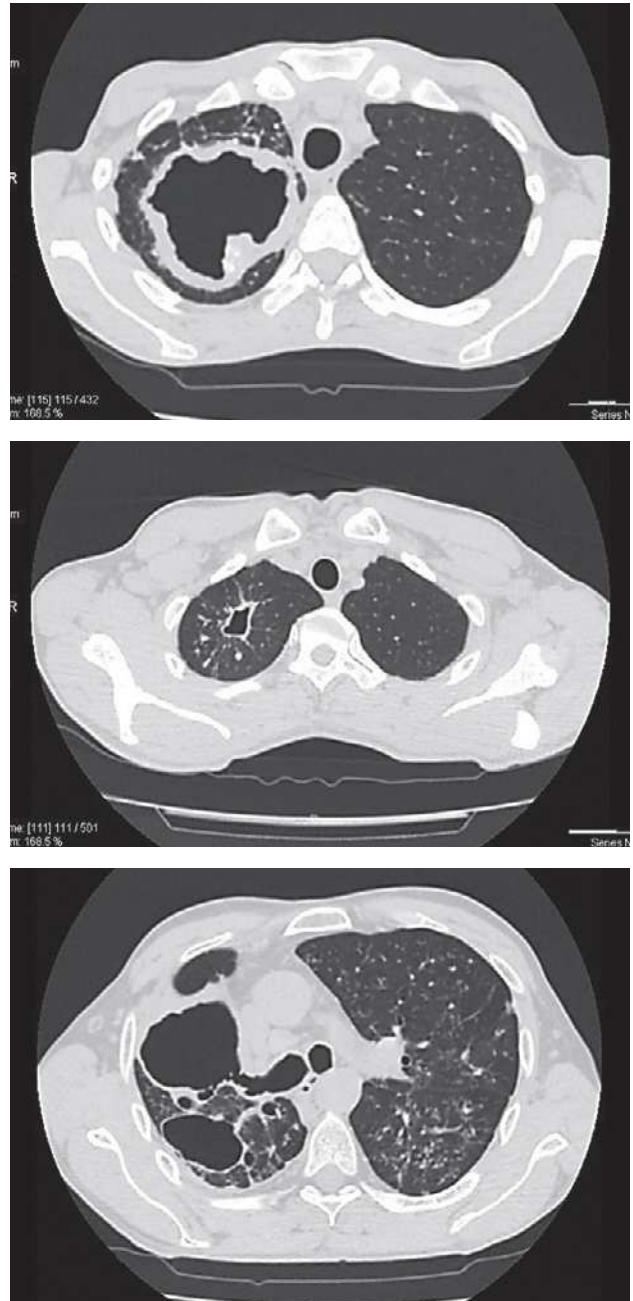


Рис. КТ-картина деструктивных изменений у пациентов с диагностированным хроническим аспергиллезом легких.

У лиц контрольной группы все результаты микологического и серологического обследования были отрицательными.

Таблица 1

Этиология хронического аспергиллеза легких у обследованных больных

Микромицеты	Количество больных				
	Всего	В зависимости от клинической формы туберкулезного процесса			
		Диссеминированный туберкулез	Кавернозный туберкулез	Фиброзно-кавернозный туберкулез	Цирротический туберкулез
<i>A. fumigatus</i>	11 (64,7%)	4 (36,37%)	2 (18,19%)	4 (36,37%)	1 (9,07%)
<i>A. niger</i>	4 (23,5%)	2 (50%)	0 (0%)	1 (25%)	1 (25%)
<i>A. flavus</i>	2 (11,8%)	1 (50%)	0 (0%)	1 (50%)	0 (0%)
Всего	17 (100%)	7 (41,18%)	2 (11,76%)	6 (35,3%)	2 (11,76%)

Типичными возбудителями хронического аспергиллеза легких являются *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus* и *A. nidulans* [6]. В нашем исследовании основным возбудителем ХАЛ у обследованных больных был *A. fumigatus* – 64,7% (табл.1). Достоверного влияния клинической формы туберкулезного процесса на развитие ХАЛ не отмечено: при диссеминированном туберкулезе $p=0,76$; при кавернозном – $p=0,51$; при фиброзно-кавернозном – $p=0,39$; при цирротическом – $p=0,48$.

Таблица 2

Развитие хронического аспергиллеза легких при различных режимах противотуберкулезной химиотерапии (ХТ)

Случаи хронического аспергиллеза легких (всего)	Режим ХТ				
	I	II	III	IV	V
17 (100%)	5 (29,41%)	3 (17,65%)	3 (17,65%)	4 (23,53%)	2 (11,76%)

В большинстве случаев (9 пациентов; 52,94%) хронический аспергиллез легких выявляли при лечении больных туберкулезом, вызванного микобактериями туберкулеза (МБТ) с множественной и широкой лекарственной устойчивостью (II, IV и V режимы ХТ). Лечение основного заболевания противотуберкулезными препаратами 1 ряда (I и III режимы ХТ) также не исключало колонизацию остаточных полостей микроскопическими грибами (8 пациентов; 47,06%). Достоверного влияния режима ХТ на развитие ХАЛ также не отмечено: при I режиме $p=0,61$; при II – $p=0,38$; при III – $p=0,22$; при IV – $p=0,55$; при V – $p=0,31$.

Таблица 3.

Развитие хронического аспергиллеза легких в зависимости от спектра применяемых антибактериальных препаратов.

Антибактериальные препараты	Общее число пациентов, получавших АБП	Частота развития хронического аспергиллеза легких	
		Число пациентов с ХАЛ, получавших АБП	Доля пациентов с ХАЛ, получавших АБП
Изониазид / Феназид	23	8	47%
Рифампицин / Рифабутин	31	11	64,7%
Пиразинамид	48	13	76,5%
Этамбутол	38	9	53%

Аминогликозиды	43	12	70,6%
Фторхинолоны	29	9	53%
Этионамид / Протионамид	32	7	41,2%
Циклосерин / Теризидон	21	6	35,3%
Парааминосалициловая кислота	15	6	35,3%
Линезолид	8	4	23,5%
Бедаквилин	8	3	17,6%
Амоксицилин + Клавулановая кислота	6	2	11,8%
Карбапенемы	6	2	11,8%

При анализе спектра применяемых антибактериальных препаратов на момент выявления хронического аспергиллеза легких отмечено преобладание в схемах лечения пиразинамида (76,5%) и инъекционных аминогликозидов (70,6%). Однако данное наблюдение, вероятнее всего, связано с включением указанных препаратов в большинство режимов лечения и требует дальнейшего наблюдения.

ВЫВОДЫ

Полученные данные свидетельствуют о высокой частоте (32,7%) развития ХАЛ у пациентов с посттуберкулезными полостными изменениями в легких. Диагностику ХАЛ осуществляли согласно критериям Европейского Респираторного Общества [6]. Предложенный комплекс микологических и иммунологических методов позволяет диагностировать ХАЛ до появления рентгенологических признаков формирования мицетом. Самым точным методом диагностики был посев БАЛ на среду Сабуро (100%). Примечательно, что в 82,4% случаев наличие микромицетов в диагностическом материале подтверждалось обнаружением IgG к *Aspergillus* spp. в сыворотке крови в диагностическом титре ($> 1:100$), в то время как прямая микроскопия БАЛ была эффективна лишь в 52,9% случаев.

Вероятность угрожающих жизни геморрагических осложнений заболевания диктует необходимость организации динамического наблюдения и обследования пациентов с хроническим деструктивным туберкулезом легких на предмет раннего выявления ХАЛ и проведения антифунгальной терапии для предупреждения формирования необратимых изменений в легких. Ввиду информативности и простоты забора исследуемого материала, в качестве скринингового теста рационально использовать ИФА крови с определением титра специфического IgG к *Aspergillus* spp.

ЛИТЕРАТУРА

1. Климко Н.Н., Козлова Я.И., Хостелиди С.Н. и соавт. Распространенность тяжелых и хронических микотических заболеваний в Российской Федерации по модели LIFE Program. Проблемы медицинской микологии. 2014; 16 (1): 3-7. [Klimko N.N., Kozlova Y.I., Hostelidi S.N. i soavt. Rasprostranennost' tyazhelyh i hronicheskikh mikoticheskikh zabolevanij v Rossijskoj Federacii po modeli LIFE Program. Problemy medicinskoj mikologii. 2014; 16 (1): 3-7 (In Russ)].
2. Riscili B.P., Wood K.L. Noninvasive pulmonary *Aspergillus* infections. Clinics in Chest Medicine. 2009; Volume 30: 315-335.
3. Sagan D., Goździuk K., Korobowicz E. Predictive and prognostic value of preoperative symptoms in the surgical treatment of pulmonary Aspergilloma. Journal of Surgical Research. 2010; Volume 163: 35-43.
4. Baradkar V.P., Mathur M., Kumar S. Uncommon presentation of pulmonary aspergilloma. Indian Journal of Medical Microbiology. 2008; 27 (3): 270-272.
5. Sagan D., Goździuk K. Surgery for pulmonary Aspergilloma in immunocompetent patients: no benefit from adjuvant antifungal pharmacotherapy. The Annals of Thoracic Surgery. 2010; 89: 1603-1611.
6. Denning D.W., Cadranell J., Beigelman-Aubry C., et al. Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management. European Respiratory Journal. 2016; 47: 45-68.

Поступила в редакцию журнала 17.12.2018

Рецензент: М.А. Шевяков

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ТРИХОФИТИИ КОЖИ ГОЛЕНИ, ОБУСЛОВЛЕННОЙ *TRICHOPHYTON* *VERRUCOSUM* (ОПИСАНИЕ СЛУЧАЯ)

Авдеенко Ю.Л. (с.н.с.), Медведева Т.В. (врач-дерматолог), Степанова А.А. (зав. лаб.), Черныш Д.Б. (врач-дерматолог)

НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

©Коллектив авторов, 2018

*Представлен нетипичный случай инфильтративно-нагноительной трихофитии, характеризующейся наличием *Trichophyton verrucosum*. Изучены клинико-морфологические особенности данного наблюдения.*

Ключевые слова: *Trichophyton verrucosum*, световая микроскопия, трихофития

HISTOLOGICAL PECULIARITY OF THE SHIN TRICHOPHYTIA CAUSED BY THE *TRICHOPHYTON* *VERRUCOSUM* (DESCRIPTION OF THE CASE)

**Avdeenko Y.L. (senior scientific collaborator),
Medvedeva T.V. (dermatologist), Stepanova
A.A. (head of the laboratory), Chernysh D.B.
(dermatologist)**

Kashkin Research Institute of Medical Mycology of North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia

©Collective of authors, 2018

*Atypical case of infiltrative trichophytia caused by presence of *Trichophyton verrucosum* has been presented. The clinic-morphological features of this observation were studied.*

Key words: *Trichophyton verrucosum*, light-microscopy, trichophytia

ВВЕДЕНИЕ

Инфильтративно-нагноительная (зооантропонозная) трихофития – инфекционное заболевание кожи, возбудителем которого являются *Trichophyton* spp. [1-3 и др.], а именно такие виды зоофильных грибов, как *Trichophyton mentagrophytes* [4], *T. verrucosum* [5] и *T. benhamiae* [6].

Инфильтративно-нагноительная трихофития, вызванная смешанной микобиотой (*Candida*, *Trichophyton*), встречается реже и сопровождается более длительным течением. В последнем случае чаще происходят обострения и рецидивы, что требует дополнительной терапии (антифунгальные, десенсибилизирующие средства).

В настоящем сообщении приведено клинико-морфологическое описание нетипичного случая поражения кожи голени человека *Trichophyton verrucosum*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для гистологических исследований кусочки кожи пациентки располагали в биопсийные кассеты, затем фиксировали в течение 6 часов 10% забуференным раствором формалина, после чего биопсийные кассеты с материалом помещали в аппарат для гистологической обработки биологических тканей Tissue-Tek®VIPTM 5Jr. для проведения проводки через серию изопропанола (IsoPrep). Последующую заливку в среду Biomix осуществляли с помощью модульной системы заливки Tissue-Tek®TECTM. Срезы получали на санном микротоме Slide 2003; для описания характера воспалительной реакции их окрашивали гематоксилин-эозином (Г-Э), для выявления элементов гриба – по методу PAS и Гомори-Грокотт. Окрашенные срезы изучали и фотографировали в световом микроскопе AxioLab.A1 (фирма Zeiss, Германия). Микологическое обследование проводили стандартными методами: КОН-тест и посев на среду Сабуро (культуральное исследование).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Пациентка Ш., 45 лет, считала себя больной с конца августа 2016 г., когда после пореза левой голени появились высыпания гнойничкового характера. При обращении к дерматологу заболевание было расценено как пиодермия; назначены системные антибактериальные препараты, местно – перманганат калия в растворе. При использовании лазеротерапии наблюдали ухудшение. Однократно было проведено микологическое исследование (КОН-тест): элементы гриба не обнаружены. Продолжено лечение системными антибиотиками; наружно использовали комбинированные с топическими кортикостероидами средства, что привело к обострению процесса.

Было высказано предположение о наличии актиномикоза левой голени, проведено бактериологическое исследование в НИИ травматологии им. Р.Р. Вредена: актиномицеты не найдены; также рекомендовано гистологическое исследование, которое было выполнено в конце ноября 2016 г. в НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина (НИИММ). В декабре 2016 г. в городском КВД осуществлено микологическое исследование, получена культура *Trichophyton verrucosum* E.

* Контактное лицо: Степанова Амалия Аркадьевна, e-mail: amaliya.stepanova@szgmu.ru

Vodin. До верификации результата исследования для наружного применения был назначен препарат, содержащий антисептик Дорогова (третья фракция), обладающий в том числе и антифунгальными свойствами, после использования которого отмечали значительное улучшение.

Сопутствующие заболевания: аутоиммунный тиреоидит (в течение двух лет принимала 75 мг в сутки L-тироксина), миома матки с аденомиозом.

При обращении к дерматологу НИИИММ в конце декабря 2016 г. клиническая картина носила достаточно скудный характер и была представлена преимущественно вторичными гиперпигментированными и гиперемированными пятнами, часть из которых обильно шелушилась, что объяснялось проведением ранее топического лечения. С учетом результатов культурального (полученного в горКВД) и патологического (проведенного в НИИИММ) исследований установлен диагноз: инфильтративно-нагноительная трихофития, вызванная *T. verrucosum*.

Опираясь на результаты культурального и патоморфологического исследований, пациентке было предложено провести курс приема тербинафина (препарат выбора при лечении трихофитии) по 250 мг/сутки в течение 6 недель с последующим контрольным микологическим тестом; в качестве наружной терапии рекомендован крем, содержащий изоканазол нитрат.

Полученный патоген (*T. verrucosum*) является достаточно редким при выделении на территории Северо-Запада России. *T. verrucosum* – зоофильный дерматомицет, обуславливающий поражения кожи у животных и человека [3, 5, 7]. Основной резервуар этой инфекции в природе – крупный и мелкий рогатый скот. Данный вид гриба вызывает у человека глубокую инфильтративно-нагноительную трихофитию гладкой кожи [3].

В 60-ые годы XX века произошло значительное снижение заболеваемости трихофитией, вызванной данным возбудителем, связанное с внедрением в ветеринарную практику высокоэффективных вакцин против этой инфекции.

При просмотре микропрепаратов кожи голени больной отмечали картину нагноительного процесса с наличием в дерме вскрывшегося абсцесса, расположенного под эпидермисом (Рис. 1 а, Г-Э). Среди лейкоцитарного экссудата в полости абсцесса при окраске по методу PAS (Рис. 1 б, стрелки) и по Гомори-Грокотт (Рис. 1 в, стрелки) наблюдали сферические (2,5-9,0 мкм) дрожжевые клетки гриба. При окрашивании по методу PAS четко выявлялись толстые светлые клеточные стенки последних (Рис. 1 д). Дрожжевые клетки гриба встречались редко. Они одиночные, расположены довольно равномерно либо в немногочисленных (по 2-3 клетки) группах, часто обнаруживали почкующиеся клетки гриба (Рис. 1 в, головки стрелок, д, стрелка). Почкование однополярное.

Помимо абсцесса, одиночные редко почкующиеся дрожжевые клетки гриба были выявлены у части волосных фолликулов (Рис. 1 д). Здесь они располагались в кутикуле, корковом и мозговом веществе волоса, а также в корневой оболочке. В корковом и мозговом веществе (Рис. 1 ж, 1) дрожжевые клетки отмечали редко, они одиночные или в группах от 1 до 4, расположены

равномерно. Почкующиеся клетки здесь не наблюдали. В корневой оболочке (Рис. 1 ж, 2, з) выявили скопления артроконидий мицелиального гриба, толщина скоплений достигала значительной толщины (от 25 до 32 мкм). Артроконидии находились в плотном контакте и часто формировали цепочки из 3 или 8 клеток. Волокнистая оболочка пораженных волос тонкая (8-11 мкм) (Рис. 1 ж, 3), неоднородная по плотности. При окраске по методу Гомори-Грокотт у части волосных фолликулов в ней (Рис. 1 е, стрелки) можно было видеть редкие, короткие, одиночные отрезки септированного мицелия толщиной 5 мкм (Рис. 1 е, з, стрелки).

Согласно морфологическим и морфометрическим данным, выявленные в коже пациентки редкие скопления дрожжевого гриба можно идентифицировать как *Malassezia* spp. [8]. Обнаруженные в волокнистой части пораженных волос гифы септированного мицелия и многочисленные артроконидии, скорее всего, принадлежали *T. verrucosum*, культура которого была получена при посеве чешуек кожи данной пациентки. В полости абсцесса нами были найдены только дрожжевые клетки в небольшом числе, тогда как в области волосного фолликула встречались дрожжевые и мицелиальные элементы грибов. Артроконидии преобладали над гифами мицелиального гриба, а также дрожжевыми клетками. Волосы были полностью разрушенными.

Липофильные дрожжевые грибы рода *Malassezia* признаны частью микробиоты кожи человека и животных. В силу ряда факторов, иммунная система организма может терять способность сдерживать развитие других представителей микробиоты, что приводит к развитию болезней.

В ходе гистологического исследования кожи голени пациентки мы не обнаружили скоплений дрожжевых клеток на поверхности эпидермиса. Присутствие дрожжевых клеток *Malassezia* spp., в определенной степени, может быть связано с длительным неадекватным применением комбинированных топических средств, содержащих глюкокортикостероиды.

В анализируемом случае мы столкнулись с наличием микотической инфильтративно-нагноительной инфекции, вызванной *T. verrucosum*, ассоциированной с *Malassezia* sp. Это редкая ситуация «топографического сосуществования» двух разных видов грибов значительно осложнила течение инфекционного процесса, его диагностику и последующее лечение. Факт присутствия дрожжевых клеток *Malassezia* sp. вблизи устья волосного фолликула вполне объясним, так как здесь расположены выводные протоки сальных желез, секрет которых необходим для их роста и развития.

Данные гистологических исследований в комплексе с культуральными исследованиями позволили более точно определить этиологию данного заболевания.

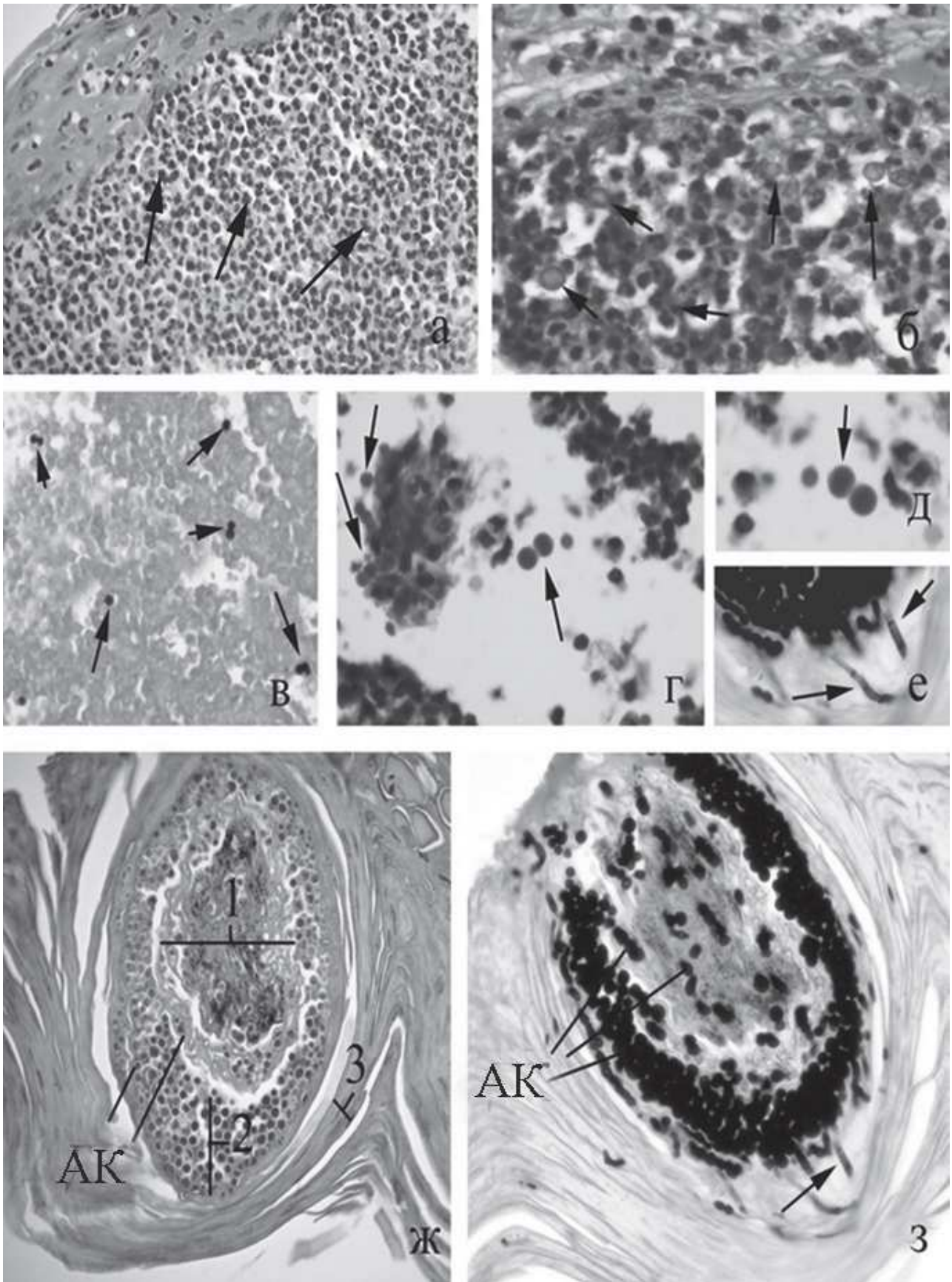


Рис. 1. Скопление лейкоцитов (а) и дрожжевых клеток (б-д) под эпидермисом кожи голени в зоне абсцесса, фрагмент (е) и общий вид (ж, з) волосяного фолликула с гифами (е, з, стрелки) и артроконидиями (ж, з). б - д - Ув.: а, в - х 200, б, г - х600, д - х 1000, е - х 500, ж, з - х200. а, ж - Г-Э, б, г, д - PAS, в, е, з - Гомори-Грокотт. АК - артроконидии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Козорез Е.С. Кожно-венерические заболевания: учеб. пособие для студентов высш. мед. учеб. заведений. М.: Изд-во ВЛАДОС-ПРЕСС, 2005: 173 с. [Kozorez E.S. Kozhno-venericheskie zabolevaniya: ucheb. posobie dlya studentov vyssh. med. ucheb. zavedenij. M.: Izd-vo VLADOS-PRESS, 2005: 173 s (In Russ)].
2. Разнатовский К.И., Родионов А.Н., Котрехова Л.П. Дерматомикозы. Руководство для врачей. СПб: Изд. Дом СПб МАПО, 2006: 184 с. [Raznatovskij K.I., Rodionov A.N., Kotrekhova L.P. Dermatomikozy. Rukovodstvo dlya vrachej. SPb: Izd. Dom SPb MAPO, 2006: 184 s. (In Russ)].
3. Wael F. El-Tras, Ahmed A. Tayel, Radi A. Mohamed, et al. Mixed rearing correlates with the existence of *Trichophyton verrucosum* pathogens in humans // *Dermatologica Sinica*. – 2015. – Vol. 33, №3. – P. 130-133.
4. Sun P.-L., Lin Y.-C., Wu Y.-H., et al. Tinea folliculorum complicating tinea of the glabrous skin: an important yet neglected entity. *Medical Mycology*. 2018; 56 (5): 521-530.
5. Yamada A., Noguchi H., Sakae H., et al. Tinea faciei caused by *Trichophyton verrucosum* in a 20-month-old female: case report and summary of reported cases in Japan. *J. Dermatol.* 2012; 39 (7): 667-669.
6. Медведева Т.В., Чилина Г.А., Пчелин И.М., Рублева И.А. Применение метода ДНК-секвенирования для диагностики трихофитии. X Юбилейная научно-практическая конференция дерматологов-венерологов и косметологов. Сборник тезисов. СПб., 2016: 73-74 [Medvedeva T.V., Chilina G.A., Pchelin I.M., Rubleva I.A. Primenenie metoda DNK-sekvenirovaniya dlya diagnostiki trihofitii. X Yubilejnaya nauchno-prakticheskaya konferenciya dermatologov-venerologov i kosmetologov. Sbornik tezisov. SPb., 2016: 73-74 (In Russ)].
7. El-Tras W.F., Tayel A.A., Mohamed R.A., et al. Mixed rearing correlates with the existence of *Trichophyton verrucosum* pathogen in humans. *Dermatologica Sinica*. 2015; 33: 130-133.
8. de Hoog G.S., et al. Atlas of clinical fungi (a recent electronic version 3.1, 2011).

Поступила в редакцию журнала: 15.08.2018

Рецензенты: Л.П. Котрехова, Л.М. Леина



ТРУДНОСТИ В ДИАГНОСТИКЕ ИНФИЛЬТРАТИВНО- НАГНОИТЕЛЬНОЙ МИКРОСПОРИИ. КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

Харисова А.Р. (аспирант)*, Хисматуллина З.Р. (зав. кафедрой)

Башкирский государственный медицинский университет (кафедра дерматовенерологии с курсами дерматовенерологии и косметологии ИДПО), Уфа, Россия

© Харисова А.Р., Хисматуллина З.Р., 2018

Представлен случай инфильтративно-нагноительной микроспории волосистой части головы, описаны трудности диагностики заболевания. Решающую роль в постановке диагноза в кратчайшие сроки сыграл перспективный метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), что позволило подобрать правильную дозировку гризеофульвина и достичь успешного выздоровления больного.

Ключевые слова: *Microsporum canis*, ПЦР, микроспория, трихофития

DIFFICULTIES IN DIAGNOSTICS OF INFILTRATIVE-SUPPURANT MICROSPORIA. CLINICAL CASE

Kharisova A.R. (postgraduate student), Hismatullina Z.R. (head of the chair)

Bashkir State Medical University (Department of Dermatology and Venereology), Ufa, Russia

© Kharisova A.R., Hismatullina Z.R., 2018

A case of infiltrative-suppurant scalp microsporia have been presented, the difficulties of diagnosis of the disease are described.

Such advanced method as polymerase chain reaction (PCR) plays a critical role in establishing of the diagnosis in the shortest possible time. That enabled us to select a proper dose of griseofulvin and achieve a successful recovery of the patient.

Key words: *Microsporum canis*, PCR, microsporia

В настоящее время дерматофитии относятся к наиболее распространенной группе грибковых заболеваний во всём мире [1, 2]. По данным разных авторов, частота дерматомикозов среди кожных заболеваний колеблется от 25 до 40% [3, 4]. Среди них чаще всего выявляют микозы стоп и микроспорию [5, 6].

Микроспория является преобладающим дерматомикозом среди детей в возрасте от 2 до 7 лет [7], наиболее часто регистрируемый возбудитель – зоофильный гриб *Microsporum canis*, вызывающий дерматомикозы у котят (кошек), собак, реже – у других животных [1, 3].

Чаще всего передача инфекции происходит от животного к человеку, редко – от человека к человеку [8]. Сезонность заболевания микроспорией обусловлена увеличением контакта детей с животными в период каникул и прогулок в тёплое время года [9].

Классифицируют микроспорию волосистой части головы и микроспорию гладкой кожи (с поражением пушковых волос, без поражения пушковых волос), в единичных случаях могут быть вовлечены в патологический процесс ногтевые пластины [10].

При поражении гладкой кожи формируются гиперемированные, шелушащиеся очаги округлой формы из папул в диаметре, которые по периферии образуют бордюр. В случае экссудации в числе папул появляются везикулы и корочки [8, 11]. Чаще всего поражаются открытые участки тела: предплечья, плечи, шея, лицо [12].

При локализации высыпания на волосистой части головы у больного обычно наблюдают 1-2 четко очерченных округлых очага до 3-5 см в диаметре с характерным муковидным шелушением. В очагах волосы обламываются на высоте 6-8 мм [5, 8].

Микозы волосистой части распространены повсеместно, могут приводить к эпидемическим вспышкам. Заболевание может быть вызвано всеми видами грибов рода *Trichophyton* и *Microsporum*, но чаще всего – *Microsporum canis*, *Trichophyton verrucosum* и *Trichophyton mentagrophytes* [2, 8, 9].

В последние годы часто регистрируют случаи атипичного течения микроспории, которые приводят к ряду диагностических ошибок [6, 8, 13].

Возбудитель микроспории – *M. canis* обнаруживают в клиническом материале больных благодаря микроскопическому и культуральному исследованиям, а также характерному изумрудному свечению при люминесцентной диагностике очагов поражения [1, 14].

Приводим наше наблюдение больного с инфильтративно-нагноительной формой микроспории.

Пациент Р., мальчик 7 лет, житель Республики Башкортостан, поступил в Республиканский кожно-венерологический диспансер (РКВД) с жалобами на очаг поражения в области волосистой части головы (Рис.). Болен в течение шести недель. Источник заражения не выявлен, контакт с какими-либо животными и больными детьми родители отрицали.

* Контактное лицо: Харисова Алина Рифгатовна, e-mail: xarisova91@bk.ru



Рис. Инфильтративно-нагноительная форма микроспории.

Самостоятельно ребёнка родители лечили комбинированной мазью, содержащей бетаметазон, гентамицин и клотримазол. Со слов матери, на фоне терапии отмечали незначительно улучшение – уменьшилось количество гнойных элементов в очаге поражения. После прекращения использования мази воспалительный процесс на коже головы усилился (появился отёк, гной), что послужило поводом обращения в РКВД. Локальный статус при поступлении в РКВД: в теменной области волосистой части головы имеется резко отграниченный очаг поражения в виде инфильтрата округлой формы диаметром до 5 см. В очаге сохранены единичные обломанные волосы на уровне 2-4 мм. Выражена воспалительная эритема розового цвета, на фоне которой визуализируются гнойнички, геморрагические и серозно-гнойные корки. При пальпации очага – болезненность. Периферические лимфоузлы увеличены до размера круглой горошины. При люминесцентном исследовании очага характерного зеленого свечения не наблюдали. При исследовании волос и кожных чешуек с очага поражения методом стандартной микроскопии с использованием 20% раствора гидроксида калия (КОН) обнаружены нити мицелия. Выявить тип расположения спор в пораженных волосах при визуализации под микроскопом (экзотрикс или эндотрикс) не удалось. При культуральном исследовании рост возбудителя дерматомикоза отсутствовал. С целью определения видовой принадлежности возбудителя данного микоза было решено использовать тест-системы с применением видоспецифичных праймеров в переменных участках ДНК (ITS1 и ITS2), обеспе-

чивающих видоспецифичную детекцию фрагментов ДНК *M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes* с размерами 182 п.н., 231 п.н. и 182 п.н. соответственно. С помощью метода полимеразной цепной реакции в клиническом материале пациента обнаружены и идентифицированы специфичные для *M. canis* фрагменты гена 5.8S рРНК.

В научной литературе описаны атипичные глубокие формы микроспории, сопровождающиеся нагноением и инфильтрацией. Такие формы при микроспории встречаются очень редко. При поражении волосистой части головы подобная форма микроспории имитирует пиодермии и другой зооантропонозный микоз – инфильтративно-нагноительную трихофитию. [15-19]. Дифференциальная диагностика в таких случаях играет ключевую роль, так как от правильного диагноза зависит выздоровление пациента.

В описанном случае продемонстрированы трудности как в клинической, так и в лабораторной диагностике данной клинической формы микроспории, имитирующей инфильтративно-нагноительную трихофитию, что делает перспективный метод ПЦР наиболее эффективным в подобных клинических ситуациях.

В лечении дерматомикозов волосистой части головы применяют препараты для системной терапии: гризеофульвин, итраконазол, тербинафин, флуконазол [20].

При лечении микроспории у детей назначают гризеофульвин внутрь в дозе 22 мг/кг/сутки в 3 приема за день (с чайной ложкой растительного масла). Терапию проводят до второго отрицательного микроскопического исследования на наличие грибов, затем приём гризеофульвина осуществляют через день в течение 2 недель, далее – 2 недели 1 раз в 3 дня. Лечение заканчивают при наличии трех отрицательных результатов исследования [8].

В результате использования метода ПЦР в кратчайшие сроки было назначено своевременно адекватное лечение. Поскольку схема терапии микроспории и трихофитии отличается дозировкой гризеофульвина (при микроспории – 22 мг/кг/сутки, а при трихофитии – 18 мг/кг/сутки), правильная постановка диагноза позволила применить адекватные дозы антимикотика и избежать формирования гризеофульвин-устойчивой формы микроспории [4]. Метод ПЦР в наблюдаемом случае помог быстро и точно определить возбудителя данной микотической инфекции у ребенка и назначить своевременное лечение.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. Грибковые инфекции. Руководство для врачей. М.: БИНОМ, 2008: 480 с. [Sergeev A.Y., Sergeev Y.V. Gribkovye infekcii. Rukovodstvo dlya vrachej. M.: BINOM, 2008: 480 s. (In Russ)].
2. Goldstein A. O., Goldstein B. G. Dermatophyte (tinea) infections. Waltham, MA: UpToDate. 2017.
3. Hay R. J. et al. Tinea capitis in Europe: new perspective on an old problem. J. of the European Academy of Dermatology and Venereology. 2001; 15 (3): 229-233.
4. Матушевская Е. В., Свищевская Е. В. Нафтифин в терапии грибковых инфекций кожи: 40 лет успеха. Вестник дерматологии и венерологии. 2014; 2: 72-77. [Matushevskaya E. V., Svirshchevskaya E. V. Naftifin v terapii gribkovykh infekcij kozhi: 40 let uspekha. Vestnik dermatologii i venerologii. 2014; 2: 72-77 (In Russ)].
5. Корсунская И.М., Тамразова О.Б. Дерматофитии с поражением волос у детей. М.: Медицина, 2005: 31 с. [Korsunskaya I.M., Tamrazova O.B. Dermatofitii s porazheniem volos u detej. M.: Medicina, 2005: 31 s. (In Russ)].
6. Rezaei-Matehkolaei A. et al. Epidemiological aspects of dermatophytosis in Khuzestan, southwestern Iran, an update. Mycopathologia. 2016; 181 (7-8): 547-553.
7. Шмелькова Е.С. Современное комплексное лечение при атипичных формах микроспории. Украинский журнал дерматологии, венерологии, косметологии. 2010; 3: 99-102. [Shmel'kova E.S. Sovremennoe kompleksnoe lechenie pri atipichnyh

- formah mikrosporii. Ukrainskij zhurnal dermatologii, venerologii, kosmetologii. 2010; 3: 99-102 (In Russ)].
8. *Медведева Т.В. и др.* Микроспория: этиология, эпидемиология, клиника, подходы к терапии. Российский журнал кожных и венерических болезней. 2007; 4: 54-58. [Medvedeva T.V. i dr. Mikrosporiya: ehtiologiya, ehpidemiologiya, klinika, podhody k terapii. Rossijskij zhurnal kozhnyh i venericheskikh boleznej. 2007; 4: 54-58 (In Russ)].
 9. *Исаева Т.И.* Клинико-эпидемиологические и медико-социальные аспекты микроспории в различных климатогеографических условиях: Автореф... дисс. канд. мед. наук. 2009: 25с. [Isaeva T.I. Kliniko-ehpidemiologicheskie i mediko-social'nye aspekty mikrosporii v razlichnyh klimatogeograficheskikh usloviyah: Avtoref... diss. kand. med. nauk. 2009: 25s. (In Russ)].
 10. *Кенинксфест Ю.В., Шайбакова Ю.Б.* Опыт применения отечественного антимикотика фунготербина при лечении микроспории в детском возрасте. Российский журнал кожных и венерических болезней. 2008; 4: 77-80. [Keninksfest Y.V., Shajbakova Y.B. Opyt primeneniya otechestvennogo antimikotika fungoterbina pri lechenii mikrosporii v detskom vozraste. Rossijskij zhurnal kozhnyh i venericheskikh boleznej. 2008; 4: 77-80 (In Russ)].
 11. *Кашкин П.Н., Шеклаков Н.Д.* Руководство по медицинской микологии. М.: Медицина, 1978: 335 с. [Kashkin P.N., Sheklakov N.D. Rukovodstvo po medicinskoj mikologii. M.: Medicina, 1978: 335 s.
 12. *Потекаев Н.С., Плиева Л.Р., Шкребец С.В.* Микроспория. Клин, дерматология и венерология. 2008; 4: 19-21. [Potekaev N.S., Plieva L.R., Shkrebec S.V. Mikrosporiya. Klin, dermatologiya i venerologiya. 2008; 4: 19-21 (In Russ)].
 13. *Антонова С.Б., Уфимцева М.А., Бочкарев Ю.М.* Атипичная микроспория: «трансформированный вариант». Случай из практики. Современные проблемы науки и образования. 2015; 5: 306-306. [Antonova S.B., Ufimceva M.A., Bochkarev Y.M. Atipichnaya mikrosporiya: «transformirovannyj variant». Sluchaj iz praktiki. Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya. 2015; 5: 306-306 (In Russ)].
 14. *Хамаганова И.В.* Проблемы диагностики и лечения трихомикозов у детей. Клин дерматол. и венерол. 2012; 6: 95-97. [Hamaganova I.V. Problemy diagnostiki i lecheniya trihomikozov u detej. Klin dermatol. i venerol. 2012; 6: 95-97 (In Russ)].
 15. *Хисматуллина З.Р., Шарафутдинова Н.Х., Габдуллина С.Р.* Ошибки в диагностике зооантропонозных микотических инфекций. Практическая медицина. 2012; 1 (56). [Hismatullina Z.R., Sharafutdinova N.H., Gabdullina S.R. Oshibki v diagnostike zooantropoznyh mikoticheskikh infekcij. Prakticheskaya medicina. 2012; 1 (56) (In Russ)].
 16. *Хисматуллина З.Р.* Зооантропонозная трихофития в Республике Башкортостан (этиология, клиника, диагностика, лечение): автореф. дисс... д-ра мед. наук. М., 2007. [Hismatullina Z. R. Zooantropoznaya trihofitiya v Respublike Bashkortostan (ehtiologiya, klinika, diagnostika, lechenie): avtoref. disc... d-ra med. nauk. M., 2007 (In Russ)].
 17. *Хисматуллина З.Р., Медведев Ю.А.* Зооантропонозная трихофития у детей: аспекты иммуномодулирующей терапии. Уфа: «Здравоохранение Башкортостана», 2005: 99 с. [Hismatullina Z.R., Medvedev Y.A. Zooantropoznaya trihofitiya u detej: aspekty immunomoduliruyushchej terapii. Ufa: «Zdravooohranenie Bashkortostana», 2005: 99 s. (In Russ)].
 18. *Султанбаева, А.Ю., Латыпов, А.Б., Хисматуллина З.Р.* Эпидемиология зооантропонозной трихофитии в Республике Башкортостан. Успехи медицинской микологии. 2005; VI: 59. [Sultanbaeva, A.Y., Latypov, A.B., Hismatullina Z.R. Epidemiologiya zooantropoznoj trihofitii v Respublike Bashkortostan. Uspekhi medicinskoj mikologii. 2005; VI: 59. (In Russ)].
 19. *Котрехова Л.П., Разнатовский К.И., Вашкевич А.А.* Особенности течения микозов кожи на современном этапе и их рациональная терапия. Consilium Medicum. Дерматология. 2014; 1: 31-34. [Kotrekhova L.P., Raznatovskij K.I., Vashkevich A.A. Osobennosti techeniya mikozov kozhi na sovremennom ehtape i ih racional'naya terapiya. Consilium Medicum. Dermatologiya. 2014; 1: 31-34 (In Russ)].
 20. *Бондаренко В.В.* Современные особенности эпидемиологии, клинического течения и терапии микроспории и трихофитии у детей и подростков: автореф. дисс... канд. мед. наук. Новосибирск, 2002: 25 с. [Bondarenko V.V. Sovremennye osobennosti ehpidemiologii, klinicheskogo techeniya i terapii mikrosporii i trihofitii u detej i podrostkov: avtoref. diss... kand. med. nauk. Novosibirsk, 2002: 25 s. (In Russ)].

Поступила в редакцию журнала 23.11.2018

Рецензент: Л.П. Котрехова



ГРИБКОВЫЕ ИНФЕКЦИИ СУСТАВОВ. СЛУЧАИ ИЗ ПРАКТИКИ

¹Кимайкина О.В. (врач-бактериолог)*, ¹Найданов В.Ф. (зав. отд.), ¹Бурков Д.В. (врач травматолог-ортопед), ¹Баженов П.А. (врач травматолог-ортопед), ¹Супрун Е.А. (врач-терапевт, клинический фармаколог), ¹Золовкина А.Г. (зав. лаб.), Васильева Н.В. (директор института, зав. кафедрой), ²Тараскина А.Е. (зав. лаб.), ²Выборнова И.В. (н.с.), ²Богомолова Т.С. (зав. лаб.), ³Григоричева Л.Г. (главный врач)

¹Федеральный центр травматологии, ортопедии и эндопротезирования, Барнаул; ²НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург; ³Реабилитационный центр компании «Премиум Строй», Барнаул, Россия

© Коллектив авторов, 2018

В статье представлены три клинических случая микотического артрита. Дрожжи *Rhodotorula slooffiae* были выделены из интраоперационных биоптатов у пациентки с диагнозом «виллонодулярный синовит» при эндопротезировании коленного сустава, *Candida albicans* – у больной с осложнением после артроскопии коленного сустава, *Candida parapsilosis* – у пациентки с перипротезной инфекцией тазобедренного сустава. Приведен краткий обзор литературных данных по клинической значимости выделенных микроорганизмов, сложностям микробиологической диагностики и антимикотической терапии грибковых инфекций суставов.

Ключевые слова: грибковые инфекции, эндопротезирование, артроскопия, перипротезная инфекция, *Rhodotorula slooffiae*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*

FUNGAL JOINT INFECTIONS. CASE REPORTS

¹Kimajkina O.V. (bacteriologist), ¹Naidanov V.F. (head of the department), ¹Burkov D.V. (traumatologist-orthopedist), ¹Bazhenov P.A. (traumatologist-orthopedist), ¹Suprun E.A. (therapist, clinical pharmacologist), ¹Zolovkina A.G. (head of the laboratory), ¹Vasilyeva N.V. (director of the institute, head of the department), ²Taraskina A.E. (head of the laboratory), ²Vybornova I.V. (scientific researcher), ²Bogomolova T.S. (head of the laboratory), ³Grigoricheva L.G. (head physician)

¹Federal Center of Traumatology, Orthopedics and Endoprosthesis, Barnaul; ²Kashkin Research Institute of Medical Mycology of North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg; ³Rehabilitation center of “the Build the Premium company”, Barnaul, Russia

© Collective of authors, 2018

Three clinical cases of fungal pathogens detection in samples of patients with various joint pathologies have been presented in the article. The yeasts *Rhodotorula slooffiae* were isolated from intraoperative biopsy specimens of a patient with endoprosthesis replacement of a knee joint with the diagnosis of villonodular synovitis, *Candida albicans* – from a patient with complication after knee arthroscopy, *Candida parapsilosis* – from a patient with periprosthetic infection of the hip joint. A brief review of the literature on the clinical significance of isolated microorganisms, problems in microbiological diagnosis and antimycotic therapy of fungal infections of joints is presented.

Key words: fungal infections of joints, endoprosthesis replacement, arthroscopy, fungal periprosthetic joint infection, *Rhodotorula slooffiae*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*

* Контактное лицо: Кимайкина Оксана Владимировна, e-mail: kimajkinao@mail.ru

За последние десятилетия возросло количество грибковых инфекций (микозов) [1, 2]. Заболевания, вызываемые микроскопическими грибами, стали важной клинической проблемой. Широкое распространение новых медицинских технологий, в том числе инвазивных диагностических и лечебных процедур, применение глюкокортикостероидов [3], старение населения планеты, иммунокомпрометирующие вирусные заболевания привели к возникновению популяции пациентов со сниженным иммунитетом, что повышает риск развития инвазивных микозов [4]. Спектр возбудителей микозов постоянно расширяется, в настоящее время известно более 600 видов грибов, вызывающих заболевания у человека [1]. Клинические проявления микозов очень разнообразны. Грибковое поражение суставов встречается редко [5-7]. Суставы поражаются вследствие гематогенной диссеминации инфекции, при инвазивных внутрисуставных процедурах, в том числе при внутрисуставном введении лекарственных препаратов. В этиологии перипротезной инфекции суставов грибковые возбудители составляют не более 1% [8, 9]. Чаще поражаются коленные суставы. Признаки общего воспаления могут отсутствовать, а инфекционный процесс в большинстве случаев проявляется локальными симптомами [10, 11]. Возбудителями грибковых артритов чаще всего являются *Candida albicans* [5, 10]. Диагноз грибкового поражения выставляется после выделения культуры гриба из пораженного участка. Даже единичная колония *Candida*, выделенная при микробиологическом исследовании аспирата или биоптата кости, должна быть расценена как клинически значимая [12-15].

В ФГБУ ФЦТОЭ МЗ России (г. Барнаул) наблюдали три случая выявления микромицетов в биологических образцах пациентов с различной патологией суставов.

Случай 1. Пациентка Ж., 77 лет. Из анамнеза: инфицирована вирусным гепатитом В. Обратилась в Федеральный центр для эндопротезирования правого коленного сустава по поводу посттравматического гонартроза III степени. При поступлении предъявляла жалобы на боли в правом коленном суставе, появившиеся после травмы, полученной 30 лет назад, и прогрессирующе нарастающие в течение последних 10 лет. Консервативное лечение по месту жительства было неэффективно. За год до поступления в стационар перенесла несколько инвазивных процедур: тотальное эндопротезирование левого коленного сустава, холецистэктомия, грыжесечение, несколько гемотрансфузий. Интраоперационно у пациентки обнаружены значительные изменения тканей сустава: выраженный склероз суставных поверхностей мышечков, отсутствие хряща на нагружаемых отделах, выраженный остеофитоз, а также клинические признаки инфекции: гипертрофированная синовиальная оболочка коричневого цвета, легко отделяющаяся от подлежащей ткани, выделение скудного жидкостного содержимого коричневого цвета с включениями фибрина после артротомии. В связи с наличием клинических признаков инфекции и высоким риском развития инфекционных осложнений в послеоперационном периоде было принято решение не проводить эндопротезирование, а ограничиться субтотальной синовэктомией и забором биологического материала на гистологическое и микробиологическое исследование. Гистологическое

заключение: виллонодулярный синовит правого коленного сустава. Микроскопическое исследование синовиальной жидкости: цитоз – 250 клеток в микролитре. Микробиологическое исследование 5 биоптатов проводили методом отпечатков на 5% кровяном агаре, тиогликолиевой среде и 1% сахарном бульоне, синовиальной жидкости – на 5% кровяном агаре, в аэробном и анаэробном флаконах анализатора Versa Trek. После инкубации в течение 120 часов при t 35 °C роста микробиоты не выявлено.

Послеоперационный период протекал без осложнений. Эндопротезирование рекомендовано не ранее, чем через 2 месяца. Через 10 месяцев пациентке выполнено эндопротезирование правого коленного сустава. В ходе операции были также отмечены значительные изменения во всех отделах сустава: отсутствие хряща на нагружаемых отделах, остеофиты, суставные поверхности надколенника не дифференцировались. Три биоптата размерами 0,6-0,7-0,5 см³ были отправлены на микробиологическое исследование. Посев гомогенизированных биоптатов проводили на 5% кровяной агар и тиогликолевую среду. Через 72 часа после инкубации при 35°C на кровяном агаре во всех образцах был обнаружен рост серых колоний размером 1-2 мм, маслянистой консистенции, в количестве 7·10¹ КОЕ/г, 2·10¹ КОЕ/г, 3·10² КОЕ/г. При микроскопии колоний выявили дрожжевые клетки овоидной формы, почкующиеся монополярно на узком основании (Рис.1).



Рис. 1. Дрожжевые клетки *Rhodotorula slooffiae*, окраска по Граму. Увеличение 1000х.

После пересева на дифференциальные среды через 72 часа при 35 °C и при комнатной температуре отмечен обильный рост серо-белых колоний на хромогенном кандид-агаре и скудный рост на агаре Сабуро. Предварительный результат идентификации: *Candida ne-albicans*. В НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина методом ДНК-секвенирования культура идентифицирована как *Rhodotorula slooffiae*. Стандартным диско-диффузионным методом [16] установлено, что культура чувствительна к флуконазолу и вориконазолу. Учитывая, что выделение двух положительных культур с фенотипически идентичными микроорганизмами является критерием перипротезной инфекции, а возникновение имплант-ассоциированной инфекции возможно при низких инфицирующих дозах микроорганизмов [9, 11, 17], пациентке была назначена антимикотическая терапия. Согласно международным клиническим рекомендациям [18], при лечении инвазивных микозов, обусловленных *Rhodotorula* spp., не рекомендуется использование азолов и эхинокандинов. Однако, учитывая необычность выделенного

вида возбудителя и результаты определения чувствительности культуры *in vitro*, пациентке был назначен флуконазол – 400 мг/сутки внутривенно капельно в течение четырех суток, далее – 400 мг/сутки перорально. При лабораторном исследовании синовиальной жидкости через 10 дней после операции роста микробиоты не обнаружено. Пациентка выписана из стационара в удовлетворительном состоянии. Рекомендован прием флуконазола 400 мг в сутки в течение 3 месяцев.

При динамическом наблюдении в послеоперационном периоде рецидива инфекции не отмечали.

Характеристика возбудителя. Грибы рода *Rhodotorula* (например, *R. mucilaginosa*, *R. glutinis*, *R. minuta*) распространены повсеместно, обитают в почве, воде, воздухе, входят в состав естественной микробиоты кожи и слизистых оболочек человека.

Вышеперечисленные виды *Rhodotorula* могут быть причиной поражения внутренних органов, кожи, подкожной клетчатки, диссеминированной инфекции, инфекции протезированных суставов [19-21]. Характеризуются низкой чувствительностью к эхинокандинам и азоловым антимикотикам, в т.ч. к флуконазолу и вориконазолу, хорошо чувствительны к амфотерицину В [18, 22].

Воротами инфекции обычно служат внутрисосудистые катетеры и желудочно-кишечный тракт. Наиболее часто проявляется рефрактерной к антибактериальным препаратам лихорадкой. Летальность при инвазивном микозе, обусловленном *Rhodotorula* spp., достигает 30-40%. Факторы риска: длительное стояние внутрисосудистых катетеров, иммунодефицит, выраженный агранулоцитоз. Диагностика основана на выявлении возбудителя из крови или другого стерильного в норме субстрата с обязательной идентификацией до вида и определением чувствительности к антимикотическим препаратам [18].

R. slooffiae Novak & Vörös-Felkai – вид, родственный *R. minuta*. Впервые был выделен в 1962 г. при посеве мазка из зева. Этот вид встречается в воде, почве, иногда высевается из клинических образцов. Некоторые штаммы *R. slooffiae* не образуют каротиноидные пигменты и формируют на питательных средах кремневые колонии [23]. В научной литературе описания случаев микозов, вызванных *R. slooffiae*, нами не обнаружено; это первый случай выявления данного вида *Rhodotorula* в качестве возбудителя микоза.

Случай 2. Пациентка О., 57 лет. В ФГБУ ФЦТОЭ выполнена артроскопическая операция: пластика передней крестообразной связки правого коленного сустава. Через месяц появилось повышение температуры тела до 38 °C. В поликлинике по месту жительства назначено лечение, в том числе внутрисуставные введения препарата дипроспан. Через 1,5 месяца после операции была выполнена пункция сустава, при микробиологическом исследовании синовиальной жидкости выявлен рост единичных колоний *S. albicans*; расценены как контаминация. Пациентка была госпитализирована в стационар по месту жительства, где в течение трех недель получала лечение по поводу серозного артрита правого коленного сустава. Внутривенно вводили препараты цефоперазон/сульбактама, метрогила, меропенема, внутрь сустава вводили препарат Ферматрон. На фоне терапии сохранялась повышенная температура тела, повышение СОЭ по Вестергрену

до 68 мм/час. Через 2 месяца после операции обратилась в ФГБУ ФЦТОЭ.

По результатам МРТ – признаки гнойного артрита. В полученной пункцией сустава синовиальной жидкости – цитоз 7250 клеток в микролитре (преобладание нейтрофилов 94%). При микробиологическом исследовании в аэробном флаконе анализатора Versa Trek через 28,3 часов получен рост. При микроскопии содержимого положительного флакона с окраской по Граму обнаружены дрожжевые почкующиеся клетки овоидной формы (Рис. 2).

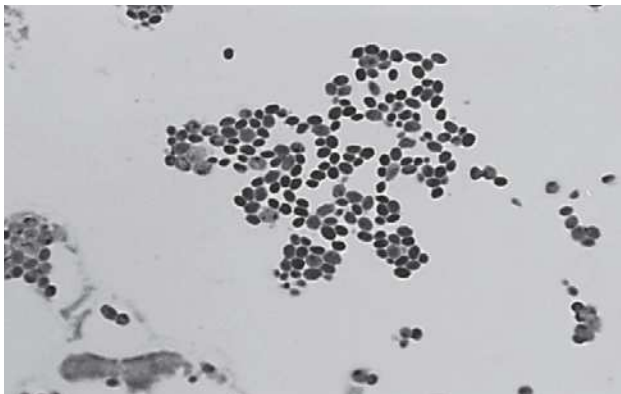


Рис. 2. Дрожжевые клетки *Candida albicans*, окраска по Граму. Увеличение 1000х.

В высевах из флакона на хромогенном кандида-агаре через 24 часа наблюдали рост характерных зеленых колоний *C. albicans*. На среде Сабуро, 5% кровяном, шоколадном агаре при инкубации в течение 120 часов при 35 °С – роста нет. Больной проведены хирургическая санация коленного сустава и удаление трансплантата передней крестообразной связки. При микробиологическом исследовании интраоперационного биоматериала: в посевах одного из четырех биоптатов через 48 часов при 35 °С на 5% кровяном агаре и на среде Сабуро выявлен рост *C. albicans* – $1 \cdot 10^3$ КОЕ/г, во флаконах анализатора Versa Trek через 120 часов – роста нет, в посевах трех биоптатов и смыве с пластиковых фиксаторов до и после УЗ-обработки через 120 часов – роста микробиоты нет. Проведено лечение: флуконазол – 400 мг/сутки внутривенно в течение 15 дней, цефуроксим – 1,5 г в/в 4 раза в сутки в течение трех дней после операции.

Исследование синовиальной жидкости перед выпиской: цитоз – 2270 клеток в микролитре (преобладание нейтрофилов – 86%), в посевах во флаконах анализатора Versa Trek, на 5% кровяном, шоколадном, Сабуро агаре через 120 часов при 35°С – роста микробиоты нет. Только на хромогенном кандида-агаре обнаружена колония *C. albicans*. Культура была отправлена в НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина для подтверждения видовой идентификации и определения чувствительности к антимикотикам. Методом MALDI-TOF масс-спектрометрии подтверждена принадлежность культуры к виду *C. albicans*. Результат определения чувствительности: культура чувствительна к флуконазолу и вориконазолу.

Пациентка выписана из стационара в удовлетворительном состоянии, без признаков воспаления в суставе, температура в пределах нормы, СОЭ по Вестергрону – 87 мм/час. Рекомендовано продолжение приема флуконазола внутрь – 400 мг/сутки в течение месяца.

В аспирационной жидкости сустава после лечения: цитоз – 3000 клеток в микролитре (преобладание нейтрофилов – 85%). Роста микробиоты не наблюдали. В соответствии с международными клиническими рекомендациями по лечению кандидоза [24], пациентке было назначено продолжение приема флуконазола в дозе 400 мг/сутки в течение 3 месяцев. На контрольном осмотре через 3 и 6 месяцев – жалобы на незначительные боли в суставе, признаков воспаления не выявлено. В образцах аспирационной жидкости цитоз – 132 и 88 клеток в микролитре соответственно. Роста микробиоты не обнаружено. В течение последующих 3 лет пациентка в клинику не обращалась.

Случай 3. Пациентка П., 78 лет. Обратилась для ревизионного эндопротезирования правого тазобедренного сустава. Первичное эндопротезирование выполнено 13 лет назад, после чего перенесла 4 реэндопротезирования в различных клиниках: по причине рецидивирующих вывихов и асептической нестабильности и последнее, двухэтапное, два года назад по поводу перипротезной инфекции. За год до возникновения перипротезной инфекции пациентке проводили стентирование коронарных артерий и оперативное вмешательство по поводу бурсита большого вертела, серомы верхней трети правого бедра. Из биоматериала сустава, забранного на микробиологическое исследование во время второго этапа последнего ревизионного эндопротезирования, выделены грибы *Candida ne-albicans*. Информация о лечении противогрибковыми препаратами отсутствует. При поступлении: в аспирационной жидкости правого тазобедренного сустава цитоз – 2000 клеток в микролитре (преобладание нейтрофилов – 78%). При микробиологическом исследовании через 28 часов в аэробном флаконе Versa Trek и через 48 часов на 5% кровяном агаре обнаружен рост серо-белых колоний дрожжеподобных грибов с неровной поверхностью, идентифицированных с помощью хромогенного кандида-агара как *Candida ne-albicans*. При микроскопии культуры обнаружены дрожжевые почкующиеся клетки овальной формы (Рис. 3). С помощью панели Sensititre™ YeastOne YO8 (Thermo SCIENTIFIC, TREK Diagnostic Systems, Великобритания) определили чувствительность штамма к флуконазолу и вориконазолу. Минимальные подавляющие концентрации антимикотиков составили 0,25 и 0,03 мг/л соответственно.

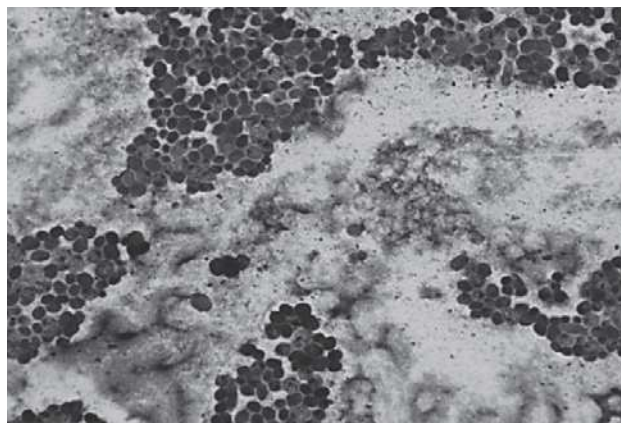


Рис. 3. Дрожжевые клетки *Candida parapsilosis*, окраска по Граму. Увеличение 1000х.

Антифунгальная терапия начата интраоперацион-

но после забора биоптатов на микробиологическое исследование: флуконазол – 400 мг/сутки внутривенно капельно, 2 недели. Локальное лечение противогрибковыми препаратами не проводили, на первом этапе установлен артикулирующий спейсер с гентамицином. В посевах 4 биоптатов, соникационной жидкости после УЗ-обработки винтов и одного компонента эндопротеза через 28,7 часов в аэробном флаконе и через 48 часов на плотных средах обнаружен рост идентичных грибов *Candida ne-albicans*. Рекомендован прием флуконазола – 400 мг/сутки перорально до второго этапа оперативного лечения. В НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина методом MALDI-TOF масс-спектрометрии культура идентифицирована как *C. parapsilosis*. Установлено, что культура чувствительна к флуконазолу и вориконазолу [16]. При исследовании синовиальной жидкости перед вторым этапом: цитоз – 594 клетки в микролитре, Д-лактат – 1,1, роста микробиоты не обнаружено. Через два месяца, при микробиологическом исследовании интраоперационных образцов и удаленного спейсера после второго этапа ревизионного эндопротезирования, роста микробиоты не наблюдали. После 2-недельного курса лечения флуконазолом в/в 400 мг/сутки рекомендовано продолжение приема препарата перорально – 400 мг/сутки в течение 6 месяцев [24].

В течение девяти месяцев после последнего оперативного вмешательства признаки инфекционного процесса в суставе отсутствовали.

Характеристика возбудителя. Грибы рода *Candida*, являясь естественными обитателями желудочно-кишечного и урогенитального трактов человека [12-14], способны к инвазии в случаях возникновения дисбаланса в экологической нише, где обычно существуют, и могут вызвать заболевание [2, 12-14]. Кандидозный артрит обычно является следствием гематогенного кандидоза [11, 12, 14]. Особенно подвержены этому пациенты с хроническими заболеваниями суставов, такими как ревматоидный артрит, а также больные с протезированными суставами. Ожидается, что заболеваемость возрастет из-за увеличения количества эндопротезирований [25-27]. В большинстве случаев грибковые артриты нативных суставов вызваны *C. albicans*. Частой причиной перипротезных инфекций являются *C. albicans* (47,3%) и *C. parapsilosis* (22,3%). Чаще всего грибами поражаются коленные суставы у женщин [26, 27]. Клинические проявления схожи с бактериальным септическим артритом [27], что нередко приводит к запоздалой диагностике и неадекватной терапии и, как следствие, к хронизации инфекции с вторичным вовлечением в патологический процесс костной ткани [28]. Общепринятая схема лечения грибковой перипротезной инфекции с доказанной эффективностью использования различных противогрибковых препаратов имеется лишь для кандидозного артрита [24]. Хорошие результаты лечения получают при 2-этапном ревизионном эндопротезировании с использованием спейсера с антимикотиком и длительных курсов противогрибковой терапии [28-30]. Имеются сообщения

об эффективном лечении грибковой перипротезной инфекции с применением одноэтапной артропластики и системной антимикотической терапии [26, 27]. Создание алгоритмов диагностики и лечения грибковых перипротезных инфекций актуально для научного сообщества.

ВЫВОДЫ

Несмотря на то, что грибковые возбудители, по статистике, составляют незначительную долю в этиологии инфекционных артритов и перипротезных инфекций суставов, практикующие травматологи и микробиологи должны быть насторожены в отношении этих микроорганизмов. За 5 лет работы ФГБУ ФЦТОЭ зарегистрировано три случая выделения грибов из биологических образцов у пациентов с патологией суставов. Во всех случаях больные были женского пола, в двух – с локализацией инфекции в коленных суставах.

Клинические признаки заболевания у пациентов были неспецифичны, а анамнез длительный с неоднократными вмешательствами из-за сложностей диагностики. Выделенный гриб *R. slooffiae* можно рассматривать и как возможную этиологическую причину поражения сустава, и как инфекционное осложнение виллонодулярного синовита. *C. albicans* стал причиной инфекционного осложнения после артроскопической операции, *C. parapsilosis* – перипротезной инфекции тазобедренного сустава.

Внедрение гриба в ткани сустава может произойти как при инвазивных процедурах непосредственно на суставе, так и при транзитной фунгемии, возникающей в результате инвазивных манипуляций на органах желудочно-кишечного и урогенитального трактов [11]. Выделение грибов из биологического материала представляет определенную сложность. Возможно, это связано с особенностью роста микроорганизмов, с неравномерным распределением в образцах и малым количеством. Для повышения эффективности при микробиологическом исследовании необходимо гомогенизировать биоптаты перед посевом и анализировать соникационную жидкость после ультразвуковой обработки удаленных компонентов эндопротезов. При исследовании необходимо использовать несколько различных питательных сред, в том числе и специальных, для культивирования грибов, по возможности, проводить изучение в автоматическом анализаторе для исследования стерильных биологических жидкостей, во флаконах с высокопитательными средами, позволяющими выделить широкий спектр микроорганизмов. Единичные колонии выросших грибов можно расценить как контаминацию пробы, но такое «заблуждение», а затем и неправильное лечение могут привести к тяжелым последствиям. Идентификация всех выделенных микромицетов и определение чувствительности к антимикотикам необходимы в связи с изменениями в этиологии инвазивного кандидоза и ростом резистентности грибов *Candida* к флуконазолу – наиболее доступному и широко используемому препарату [6, 14, 31, 32].

ЛИТЕРАТУРА

1. www.GAFFI.org
2. Bongomin F, Gago S, Oladele R.O., Denning DW. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. J. Fungi (Basel). 2017; 3 (4): 57.

3. Artiaco S., Ferrero A., Boggio F., Colzani G. Pseudotumor of the hip due to fungal prosthetic joint infection. Case reports in orthopedics. 2013; 3.
4. Васильева Н.В., Клишко Н.Н., Цинзерлинг В.А. Диагностика и лечение инвазивных микозов. Современные рекомендации. Вестник медицинской академии последипломного образования. Санкт-Петербург, 2010: 5-17. [Vasilyeva N.V., Klimko N.N., Zinzerling V.A. Diagnostika i lechenie invazivnyh mikofov. Sovremennyye rekomendacii. Vestnik medicinskoj akademii poslediplomnogo obrazovaniya. Sankt-Peterburg, 2010: 5-17. (In Russ)].
5. Çevik R., Tekin R. & Gem M. *Candida* arthritis in a patient diagnosed with spondyloarthritis. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2016; 49 (6): 793-795.
6. Ochsner P.E., Borens O., Bodler P.M.. Infections of the musculoskeletal system. Published by Swiss orthopaedics and the Swiss Society for Infectious Diseases expert group "Infections of musculoskeletal system". 2014: p. 223
7. Tuck A. Mycotic septic arthritis of the ankle joint. Am. J. Orthop. 2016; 45 (7): E478-E480.
8. Wang Q.-J., Shen H., Zhang X.-L., et al. Staged reimplantation for the treatment of fungal peri-prosthetic joint infection following primary total knee arthroplasty. Orthopedics and Traumatology: Surgery & Research. 2015; 101 (2): 151-156.
9. Azzam K., Parvizi J., Jungkind D., et al. Microbiological, clinical, and surgical features of fungal prosthetic joint infections: A multiinstitutional experience. The Journal of Bone and Joint Surgery 2009; 91 (6): 142-149.
10. Gamaletsou M.N., Rammaert B., Bueno M.A. *Candida* arthritis: analysis of 112 pediatric and adult cases. Open Forum Infect Dis. 2015; 3 (1): ofv207.
11. Gehrke T., Parvizi J. Proceedings of the International Consensus Meeting on Periprosthetic Joint Infection. Chairmen, FRCS. Philadelphia, USA, 2013.
12. Kauffman C.A., Marr K.A., Thorner A.R. Infections caused by yeast-like fungi of the genus *Candida*. Review of the literature as of January 2012 (UpToDate) Available at: <http://www.rusmedserv.com/mycology/html/kandidoz20.htm>
13. Елинов Н.П., Васильева Н.В., Степанова А.А., Чилина Г.А. *Candida*. Кандидозы. Лабораторная диагностика/ Под редакцией з.д.н. РФ проф. Елинова Н.П. СПб., 2010; 224 с. [Elinov N.P., Vasilyeva N.V., Stepanova A.A., Chilina G.A. *Candida*. Kandidozy. Laboratornaya diagnostika / Pod redakciej z.d.n. RF prof. Elinova N.P. SPb., 2010; 224 с. (In Russ)].
14. Клишко Н.Н. Микозы: Диагностика и лечение. Руководство для врачей. 3-е изд. М.: Фармтек, 2017: 272 с. [Klimko N.N. Mikozy: Diagnostika i lechenie. Rukovodstvo dlya vrachej. 3 izd. M.: Farmtek, 2017: 272 s. (In Russ)].
15. Suena-Estrella M., Verweij P.E., Arendrup M.C., et al. ESCMID guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: diagnostic procedures. Clin Microbiol Infect. 2012; 18 (7): 9-18
16. Клинические рекомендации. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Версия-2018-03. [Klinicheskie rekomendacii. Opredelenie chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antimikrobnym preparatam. Versiya-2018-03 (In Russ)].
17. Parikh M.S., Antony S. A comprehensive review of the diagnosis and management of prosthetic joint infections in the absence of positive cultures. Journal of Infection and Public Health. 2016; 9 (5):545-56.
18. Arendrup M.C., Boekhout T., Akova M., et al. ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections. Clin Microbiol Infect. 2014; 20 (3): 76-98.
19. Savini V., Sozio F., Catavittello C., et al. Femoral prosthesis infection by *Rhodotorula mucilaginosa*. Journal of Clinical Microbiology 2008; 46 (10): 3544-3545.
20. Wirth F., Z. Goldani L. Epidemiology of *Rhodotorula*: An emerging pathogen. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases. 2012; 7 p. Available from: URL: <http://www.researchgate.net/>
21. Cutrona A.F., Shah M., Himes M.S., Miladore M.A. *Rhodotorula minuta*: an unusual fungal infection in hip-joint prosthesis. American Journal of Orthopedics. 2002; 31 (3): 137-140.
22. de Hoog G.S., Guarro J., Gené J., Figueras M.J.. Atlas of Clinical Fungi (on-line). Version 4.1.4
23. The Yeasts, a Taxonomic Study. Vol.3, 5th ed. /Ed. by C.P. Kurtzman, J. Fell, T. Boekhout. Elsevier, 2011: 1922-1923.
24. Pappas P.G., Kauffman C.A., Andes D.R., et al. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. Clin. Infect. Dis. 2016; 62 (4): e1-e50.
25. Trofa D., Gácsér A. & Nosanchuk J.D. *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen Clin. Microbiol. Rev. 2008; 21(4): 606-625.
26. Cobo F., Rodríguez-Granger J., Sampedro A., et al. *Candida* prosthetic joint infection. A review of treatment methods. J. Bone Jt. Infect. 2017; 2 (2): 114-121.
27. Azamgarhi T., Shah A., Palanivel S., et al. Clinical experience of treating of fungal periprosthetic joint infection in a specialist orthopedic Hospital. 36 Annual Meeting of the European Bone and Joint Infection Society. Nantes, France. Abstracts Book. 2017: 122 p.
28. Chang-Hun Lee, Jae-Min Oh, Seong-Rheol Oh, et al. *Candida* arthritis after arthroscopic arthroplasty in a patient without predisposing factors. Open Rheumatol. J. 2010; 4: 7-9.
29. Jakobs O., Schoof B., Klatter T.A., et al. Fungal periprosthetic joint infection in total knee arthroplasty: a systematic review. Orthop. Rev (Pavia). 2015; 7 (1): 5623.
30. Kuiper L.W. 2-stage revision recommended for treatment of fungal hip and knee prosthetic joint infection. Acta Orthopædica. 2013; 84 (6): 11.
31. Vasilyeva N.V., Raush E.R., Rudneva M.V., et al. Etiology of invasive candidosis agents in Russia: a multicenter epidemiological survey. Front. Med. 2018; 12 (1): 84-91.
32. Whaley S.G., Berkow E.L., Rybak J.M., et al. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-*albicans Candida* species. Front Microbiol. 2017; 12 (7): 2173.

Поступила в редакцию журнала 24.12.2018
Рецензент: Н.Н. Клишко



СКАНИРУЮЩАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ *ASPERGILLUS FUMIGATUS* FRES.

Степанова А.А. (зав. лаб.)*, Чилина Г.А. (зав. лаб.),
Баракаева Ф.Р. (студентка)

НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

© Коллектив авторов, 2018

Изучены особенности строения клеток воздушного вегетативного мицелия и конидиогенного аппарата у *Aspergillus fumigatus* Fres. (штамм РКПГФ-1248) с помощью сканирующей электронной микроскопии. Клеточные стенки зрелых клеток гиф мицелия имели складчатую мелкозернистую текстуру, что обусловлено наличием на их поверхности внеклеточного матрикса. Конидиеносцы и головки конидиогенных аппаратов на всех стадиях развития снабжены гладкими клеточными стенками. Показано, что стеригмы (фиалиды) конидиогенных аппаратов у *A. fumigatus* закладываются и формируются синхронно, тогда как конидии – асинхронно. Зрелые конидии имели на своей поверхности густо расположенные шипики.

Ключевые слова: *Aspergillus fumigatus*, клетки гиф, конидиогенный аппарат, сканирующая электронная микроскопия, ультраструктура

SCANNING ELECTRON MICROSCOPY OF *ASPERGILLUS FUMIGATUS* FRES.

Stepanova A.A. (head of the laboratory), Chilina G.A.
(head of the laboratory), Barakaeva F.R. (student)

Kashkin Research Institute of Medical Mycology of North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia

© Collective of authors, 2018

Peculiarities of the structure of aerial hyphal cells and conidiogenous apparatus of the strain of *Aspergillus fumigatus* Fres. (РКПГФ-1228) with using of scanning electron microscopy were studied. Cell walls of mature hyphal cells of mycelium had folded fine-granular texture that was caused by presence on their surface extracellular matrix. Stipes and the heads of conidiogenous apparatus in all stages of development possess smooth cell walls. It was shown that sterigmata of the conidiogenous apparatus of *A. fumigatus* were initiated and developed synchronously whereas conidia – asynchronously. Mature conidia had on the surfaces densely located spikes.

Key words: *Aspergillus niger*, conidiogenous apparatus, hyphal cells, scanning electron microscopy, ultrastructure

ВВЕДЕНИЕ

Внедрение молекулярно-генетических методов в диагностику микозов, безусловно, способствовало выявлению новых видов, повышению эффективности диагностических исследований, особенно в случаях микотических инфекций, обусловленных редкими и «криптическими» видами. Однако морфологические исследования нитчатых патогенных грибов по-прежнему имеют важное значение в диагностике инвазивного аспергиллеза (возбудитель – *Aspergillus fumigatus*).

В связи с этим метод сканирующей электронной микроскопии имеет неоспоримое значение для изучения биологического разнообразия грибов, особенностей их микроморфологии, выявления признаков тонкого строения, необходимых для их систематики.

Ранее [1] с помощью сканирующего электронного микроскопа мы исследовали строение клеток колоний *A. fumigatus* штамма РКПГФ-1172, выделенного из промывных вод больного аспергиллезом. За последнее время был достигнут значительный прогресс в методах подготовки образцов и заметное совершенствование сканирующих микроскопов. Отметим, что несмотря на это, вопрос об особенностях штаммных различий в микроморфологии *A. fumigatus* на электронно-микроскопическом уровне остается малоизученным, что и стало целью настоящего исследования.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследовали культуру *A. fumigatus* Fres. (штамм РКПГФ-1248) из коллекции НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, выделенную из мокроты пациента с инвазивным аспергиллезом (Л., 53 года). Данный вид гриба был идентифицирован методом таргетного ДНК-секвенирования по Ф. Сэндржеру [CISI MM-18A] по локусу b-tubulin. Культуру гриба выращивали на среде Чапека в термостате при 27 °С. Через 5, 10 и 20 дней после посева кусочки агаризированной среды с разными участками колонии гриба фиксировали для целей сканирующей электронной микроскопии в 3% растворе глутаральдегида на какодилатном буфере (рН 7,2), затем пост-фиксировали в 1% растворе осмиевой кислоты, проводили через серию спиртов возрастающей концентрации (30, 50 и 70°), высушивали при критической точке на приборе НСП-2 и напыляли золотом на ИВ-3. Образцы изучали в сканирующем электронном микроскопе JSM 35.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Вегетативный мицелий. Гифы воздушного мицелия по самому краю колонии расположены по поверхности питательной среды рыхло и хаотично (Рис. 1 а). Они извилистые, одиночные либо в группах по 2-3, часто контактировали между собой. Диаметр гиф варьировал от 1,5 до 3 мкм. В этой части мицелия встречались апикально растущие концевые клетки мицелия (Рис. 1 а, стрелки). Картины контакта апикальных сегментов гиф, ранее выявленные нами для колонии *A. niger* [2], для *A. fumigatus* не характерны. Структура поверхности клеточных стенок молодых гиф гладкая либо слегка складчатая. Только в этой части колонии ввиду рыхлого расположения гиф воздушного мицелия можно было наблюдать поверхность питательной

* Контактное лицо: Степанова Амалия Аркадьевна,
e-mail: amaliya.stepanova@szgmu.ru

среды и контуры гиф субстратного мицелия (Рис. 1 а, головки стрелок), локализующиеся в толще твердой питательной среды.

По мере продвижения к центру колонии плотность расположения гиф мицелия заметно возрастала (Рис. 1 г, д), их диаметр был равен в среднем 4 мкм. Со временем довольно гладкая поверхность гиф воздушного мицелия (1 б) становилась сильно «складчатой», с характерной мелкозернистой текстурой (Рис. 1 в). Так выглядит характерный для зрелых клеток воздушного мицелия [1] и тканевых форм этого вида [3-6] хорошо развитый внеклеточный матрикс, который имеет специфичную структуру и представляет собой интегральную часть клеточной стенки [7]. Интересно, что зрелые клетки гиф *A. niger* в сканирующем микроскопе [2] также имели «складчатую» мелкозернистую текстуру, что также обусловлено присутствием внеклеточного матрикса. В той части колонии гриба, где начинали встречаться редкие конидиогенные аппараты (Рис. 1 г, д), гифы разного диаметра располагались хаотично, постепенно «заслоняя» собой поверхность питательной среды.

В средней спороносящей части колонии гриба (Рис. 1 и) с многочисленными формирующимися конидиеносцами и разновозрастными конидиогенными аппаратами характер пространственной ориентации гиф оставался без изменений. Появлялись скопления сильно деформированных, стареющих или отмерших клеток гиф. Центральная часть колонии состояла из сильно смятых отмерших гиф (Рис. 1 н), на поверхности которых складчатая мелкозернистая текстура уже не выявлялась. Это обусловлено разрушением внеклеточного матрикса в ходе старения, что было показано и методами трансмиссионной электронной микроскопии [8].

Конидиогенный аппарат. Формирующиеся конидиеносцы локализовались довольно скученно. Они, как и закончившие рост конидиеносцы, имели гладкие клеточные стенки (Рис. 1 г, ж), что было характерно и для ранее изученного штамма *A. fumigatus* [1]. Высота закончивших рост конидиеносцев варьировала от 300 до 500 мкм, а ширина – от 5 до 8 мкм. По завершении роста конидиеносца его апекс пузыревидно вздувался, формируя зачаток головки конидиогенного аппарата (Рис. 1 а). Изодиаметрический рост последней приводил к формированию головки обратно-грушевидной формы. Вскоре в апикальной части закончившей рост головки на 2/3 ее поверхности начинали синхронно и в шахматном порядке формироваться зачатки стеригм (фиалид, рис. 1 е). Закладка стеригм и у конидиеносцев другого ранее изученного штамма *A. fumigatus* [1], а также *A. niger* [2, 8], происходила синхронно и в шахматном порядке.

В расширенном апексе зачатки стеригм растут синхронно апикальным ростом, по его завершении они имели цилиндрическую форму и размеры, соответственно, 6-8 x 2-3 мкм. Стеригмы по завершении роста располагались довольно плотно относительно друг друга (Рис. 1 ж, з, и), структура поверхности их клеточных стенок была мелкозернистой. В нижней трети стеригм выявляли умеренные скопления гомогенной слизи (Рис. 1 ж, з, стрелки).

В апексе стеригм закладка первых зачатков конидий происходила синхронно (Рис. 1 ж), тогда как по-

следующих – асинхронно (Рис. 1 з, и). Формирование конидии начиналось с образования небольшого вздутия (инициаль конидии) в верхней части стеригмы (Рис. 1 ж), изодиаметрический рост которой приводил к формированию сферической формы (Рис. 1 з) зрелой конидии (от 2,5 до 3 мкм). На ее поверхности отмечали элементы слоя орнаментации в виде густо расположенных невысоких шпиков (Рис. 1 з). Сходное строение характерно для зрелых конидий других штаммов *A. fumigatus* [1, 9 и др.]. На самом деле, созревание конидий аспергиллов продолжалось после того, как они покидали головку конидиогенного аппарата. Много-численные скопления одиночных либо в группах зрелых или созревающих конидий можно было наблюдать на поверхности питательной среды (Рис. 1 к). При созревании конидий происходило их обезживание, при этом их размеры становились меньше, а элементы скульптуры – более выраженными.

Конидиальные головки в период формирования конидий имели диаметр от 50 до 400 мкм. Они колонковидные, несут на своей поверхности многочисленные зрелые конидии, не образующие цепочки (Рис. 1 з). Последние не характерны и для конидий другого штамма *A. fumigatus* [1]. При изучении на малом увеличении сканирующего электронного микроскопа продольного среза центральной части колонии гриба наблюдали высокую плотность расположения конидиогенных аппаратов (Рис. 1 м, 1). Глубина проникновения гиф субстратного мицелия в плотную питательную среду небольшая, составляла в среднем 50 мкм (Рис. 1 м, 2). Клеточная стенка конидиеносцев на завершающих стадиях конидиогенеза подвергалась старению. При этом она сильно деформировалась, и на ее поверхности появлялись довольно глубокие регулярно расположенные продольные складки (Рис. 1 л, стрелки).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявленная нами складчатая тонко-гранулярная текстура поверхности зрелых клеток гиф воздушного мицелия *A. fumigatus*, в отличие от ранее изученного другого штамма этого вида [7], обусловлена наличием внеклеточного матрикса, отсутствующего на поверхности конидиеносцев и головок конидиогенных аппаратов данного вида, а также субстратного мицелия. Возможно, это обусловлено усовершенствованием методов подготовки образцов для сканирующей электронной микроскопии, а также межштаммовыми различиями. Для конидиогенных аппаратов изученного штамма *A. fumigatus* характерно синхронное формирование стеригм (фиалид) и асинхронное – конидий, что типично и для ранее изученного нами штамма этого вида гриба [1]. Зрелые конидии *A. fumigatus* имели характерную шиповатую скульптурированную поверхность.

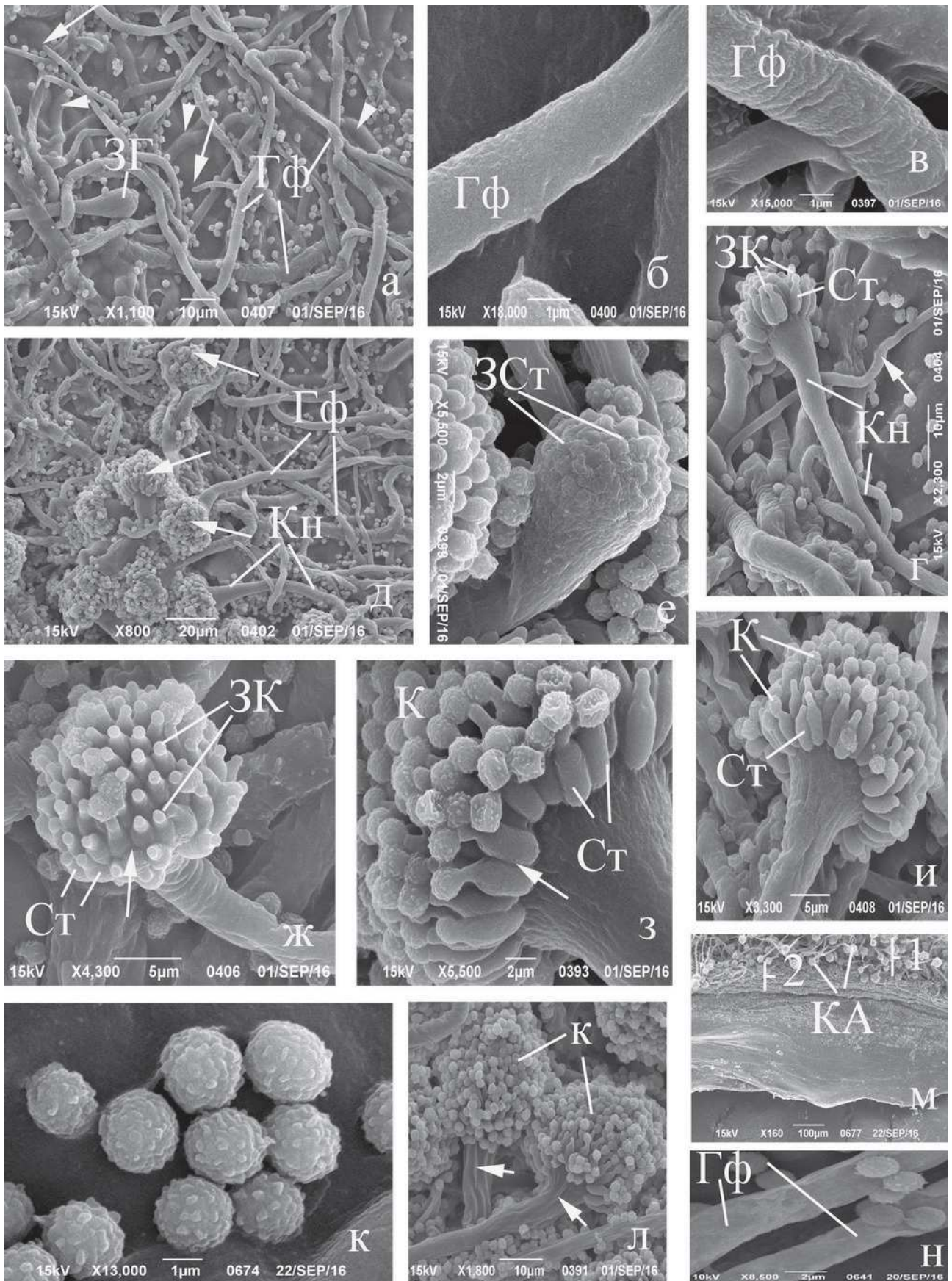


Рис. 1. Ультраструктура клеток вегетативного мицелия и конидиеносцев *A. fumigatus* (РКПГГ- 1248) в сканирующем электронном микроскопе. Условные обозначения: Гф – гифа(ы), ЗГ – зрелая головка, ЗК – зачатки конидий, ЗСт – зачатки стеригм, К – конидии, КА – конидиальные аппараты, Кн – конидиеносец(ы), Ст – стеригма(ы).

ЛИТЕРАТУРА

1. Степанова А.А., Сеницкая И.А. Цитологическое изучение морфогенеза конидиогенного аппарата *Aspergillus fumigatus*. Проблемы медицинской микологии. 2005; 7 (3): 41-49. [Stepanova A.A., Sinickaya I.A. Citologicheskoe izuchenie morfogeneza konidiogenogo apparata *Aspergillus fumigatus*. Problemy medicinskoj mikologii. 2005; 7 (3): 41-49 (In Russ)].
2. Степанова А.А., Васильева Н.В., Чилина Г.А. Сканирующая электронная микроскопия *Aspergillus niger*. Проблемы медицинской микологии. 2018; 20 (2): 40-44. [Stepanova A.A., Vasil'eva N.V., Chilina G.A. Skaniruyushchaya ehlektronnaya mikroskopiya *Aspergillus niger*. Problemy medicinskoj mikologii. 2018; 20 (2): 40-44 (In Russ)].
3. Степанова А.А., Босак И.А., Сеницкая И.А. Цитологическое исследование *Aspergillus fumigatus* Fres. в легких мышей. Проблемы медицинской микологии. 2013; 15 (1): 52-58. [Stepanova A.A., Bosak I.A., Sinickaya I.A. Citologicheskoe issledovanie *Aspergillus fumigatus* Fres. v legkih myshej. Problemy medicinskoj mikologii. 2013; 15 (1): 52-58 (In Russ)].
4. Степанова А.А., Васильева Н.В., Борзова Ю.В. и др. Электронно-микроскопическое изучение аспергиллеза легких человека на примере архивного материала. Проблемы медицинской микологии. 2014; 16 (3): 70-79. [Stepanova A.A., Vasil'eva N.V., Borzova Y.V. i dr. Elektronno-mikroskopicheskoe izuchenie aspergilleza legkih cheloveka na primere arhivnogo materiala. Problemy medicinskoj mikologii. 2014; 16 (3): 70-79 (In Russ)].
5. Stepanova A.A., Vasilyeva N.V., Zhang F., et al. Electron-microscopic investigations of invasive aspergillosis, caused with *Aspergillus fumigatus*. Problems in medical mycology. 2015; 17 (3): 38-41.
6. Степанова А.А., Васильева Н.В., Чжан Ф. и др. Ультраструктурная организация *Aspergillus* spp. в тканях легких пациентки. Проблемы медицинской микологии. 2018; 20 (2): 29-39. [Stepanova A.A., Vasil'eva N.V., Chzhan F. i dr. Ul'trastrukturnaya organizatsiya *Aspergillus* spp. v tkanyah legkih pacientki. Problemy medicinskoj mikologii. 2018; 20 (2): 29-39 (In Russ)].
7. Степанова А.А., Сеницкая И.А., Авдеенко Ю.Л. Субмикроскопическое изучение клеток вегетативного мицелия *Aspergillus fumigatus* Fres. Проблемы медицинской микологии. 2004; 6 (3): 34-40. [Stepanova A.A., Sinickaya I.A., Avdeenko Y.L. Submikroskopicheskoe izuchenie kletok vegetativnogo miceliya *Aspergillus fumigatus* Fres. Problemy medicinskoj mikologii. 2004; 6 (3): 34-40 (In Russ)].
8. Степанова А.А., Сеницкая И.А. Ультраструктурные аспекты старения клеток некоторых видов рода *Aspergillus*. Проблемы медицинской микологии. 2009; 11 (4): 24-29. [Stepanova A.A., Sinickaya I.A. Ul'trastrukturnye aspekty stareniya kletok nekotoryh vidov roda *Aspergillus*. Problemy medicinskoj mikologii. 2009; 11 (4): 24-29 (In Russ)].
9. Pihet M., Vandeputte P., Tronchin G., et al. Melanin is an essential component for the integrity of the cell wall *Aspergillus fumigatus* conidia. BMC Microbiology. 2009; 9: 177.
10. Степанова А.А., Сеницкая И.А. Морфогенез конидиогенного аппарата *Aspergillus niger* по данным электронной микроскопии. Проблемы медицинской микологии. 2004; 6 (2): 37-48. [Stepanova A.A., Sinickaya I.A. Morfogenez konidiogenogo apparata *Aspergillus niger* po dannym ehlektronnnoj mikroskopii. Problemy medicinskoj mikologii. 2004; 6 (2): 37-48 (In Russ)].

Поступила в редакцию журнала: 19.11.2018

Рецензент: В.С. Митрофанов



ГИСТОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТРЕХ СЛУЧАЕВ МИКОТИЧЕСКОГО РИНОСИНОСИТА

Степанова А.А. (зав. лаб.)*, Авдеенко Ю.Л. (с.н.с.), Шульгина М.В. (зам. директора по научной работе), Сидоренко С.В. (проф. кафедры)

НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

©Коллектив авторов, 2018

Изучены гистологические особенности трех случаев неинвазивного микотического риносинусита, обусловленные разными представителями мицелиальных грибов. Представлены схемы, демонстрирующие разнообразие анатомического строения «грибного тела» содержимого околоносовой пазухи. Детально изложены особенности воспалительной реакции описываемых случаев.

Ключевые слова: световая микроскопия, микотический риносинусит, смешанные инфекции

HISTOLOGICAL INVESTIGATION OF THE TREE CASES OF MYCOTIC RHINOSINUSITIS

Stepanova A.A. (head of the laboratory), Avdeenko Y.L. (senior scientific collaborator), Shulgina M.V. (deputy director for scientific work), Sidorenko S.V. (prof. of the department)

Kashkin Research Institute of Medical Mycology of North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia

©Collective of authors, 2018

Histological peculiarities of the three cases of not invasive fungal rhinosinusitis caused with different members of the filamentous fungi were studied. The diagrams demonstrated the varieties of anatomical structure of the «fungal body» in paranasal contents were presented. The peculiarities of the inflammatory reaction were presented for described cases.

Key words: light microscopy, mixed infection, mycotic rhinosinusitis

ВВЕДЕНИЕ

Цель настоящего исследования – изучение особенностей анатомического строения «грибного тела», а также характера воспалительной реакции при микотическом синусите.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В данной работе изучали консультативный материал, поэтому у нас не было возможности посева культур грибов из околоносовой пазухи.

Материал фиксировали 10%-ым раствором забуференного раствора формалина. Далее образцы обрабатывали по методике, описанной нами ранее [1, 2]. Срезы окрашивали гематоксилином-эозином (Г-Э) и по методу PAS.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Случай 1. Пациенту К. (38 лет) был поставлен диагноз «хронический полипозный синусит правой пазухи носа в стадии обострения». В операционном материале выявлено несколько фрагментов слизистой оболочки носа и нижележащей ткани значительных размеров обычного строения. Специфической особенностью данного случая было то, что в просвете пазухи носа пациента обнаружили четыре скопления так называемого «грибного тела», различающихся по размерам и особенностям анатомического строения.

Первое «грибное тело» небольших размеров наблюдали вблизи фрагмента слизистой оболочки носа (Рис. 1 а, стрелки, 2 а, стрелки), где хаотично ориентированные, широкие (7,0-9,0 мкм), светло-фиолетовые (Г-Э) или бледно-розовые (PAS) гифы формировали одно довольно массивное скопление слегка вытянутой формы (Рис. 1 а, 1, 2 б) с неровным контуром, окруженное толстым слоем фибрина.

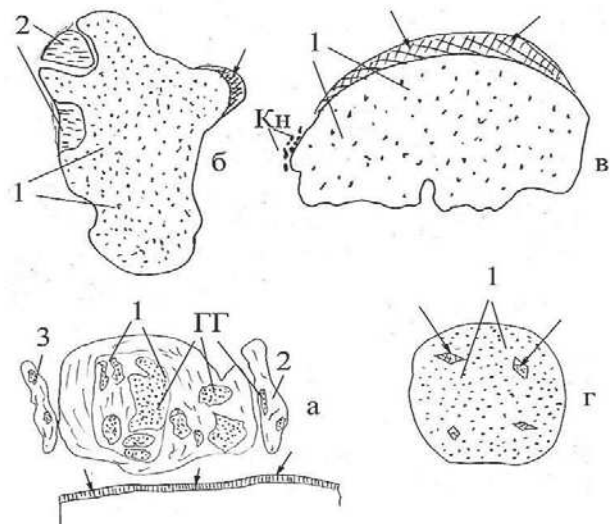


Рис. 1. Схема, иллюстрирующая анатомическое строение «грибного тела» околоносовой пазухи (первый случай). Основные обозначения здесь и на рисунках 2 и 3: ГГ – гифы гриба, ГТ – грибное тело, К – конидии, Кр – кристаллы, Ми – мицетома, Му – муцин, Ф – фибрин.

К данному «грибному телу» вплотную примыкали два образования сходного анатомического строения – погруженные в фибрин небольшие скопления плотно расположенных широких (8,0-9,0 мкм) гиф (Рис. 1 а, 2). Наличие широких гиф с редкими септами, скорее все-

* Контактное лицо: Степанова Амалия Аркадьевна, e-mail: amaliya.stepanova@szgmu.ru

го, свидетельствует о нахождении в данном «грибном теле» мукормицета. Ранее нам приходилось наблюдать присутствие гиф мукормицета, непосредственно локализующегося внутри «грибного тела», образованного другим видом мицелиального гриба [1, 2].

Однако это первое описание «грибного тела», сформированного только мукормицетом, в котором фибрин выполняет, с одной стороны, роль субстрата для

его роста и развития, а с другой – защитную функцию. Нельзя исключать и тот факт, что фибрин также может быть источником питательных веществ, необходимых для роста и развития гриба. В данном случае воспаление было обусловлено наличием умеренного количества нейтрофилов и эозинофилов, расположенных в скоплениях фибрина, окружающих скопления грибов (табл.).

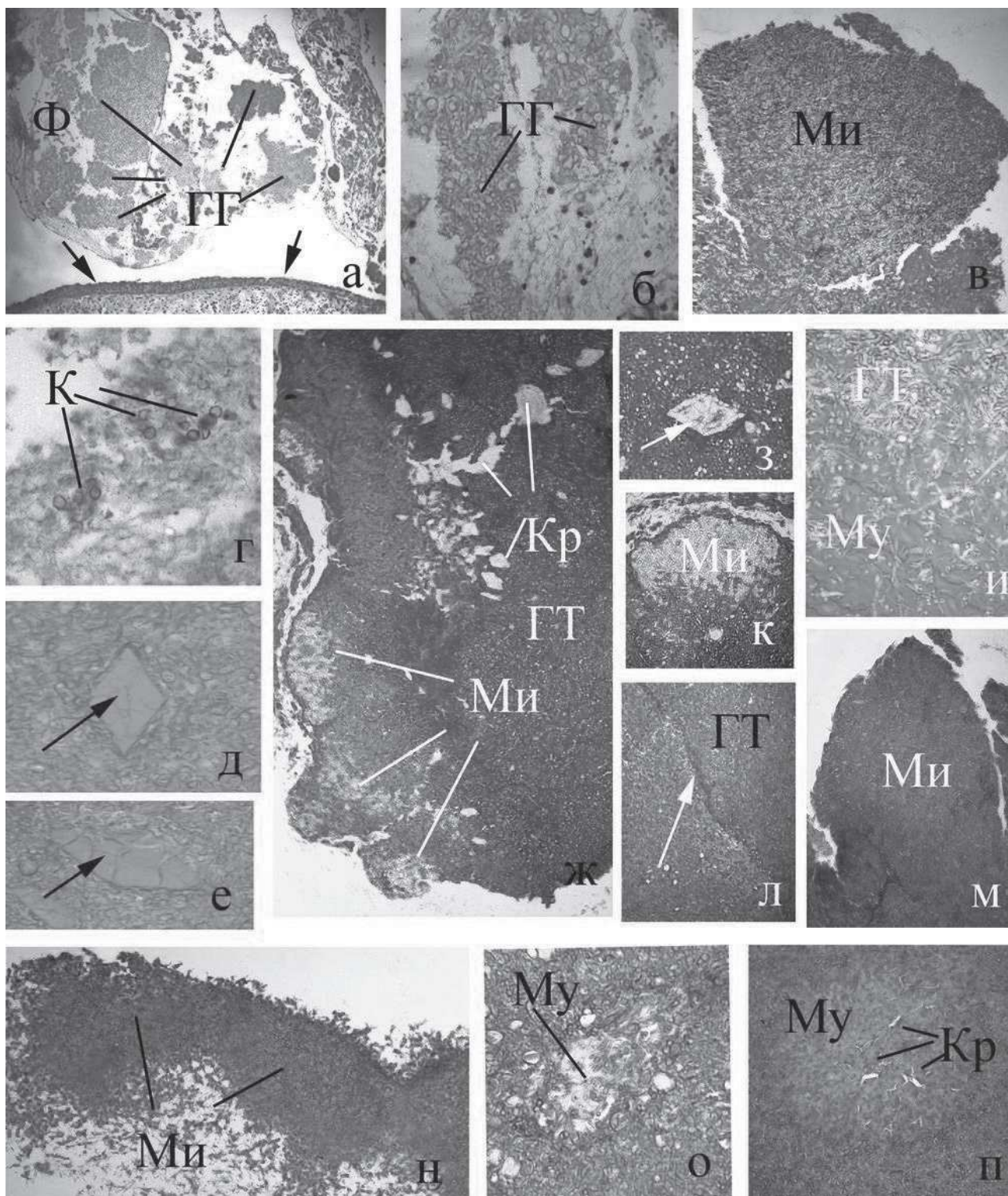


Рис. 2. Особенности строения «грибного тела» изученных случаев в световом микроскопе:

а, б, г, ж, з, к, м, н – Г-Э; в, д, е, и, л, о, п – ПАС метод.

Ув.: а, в, ж, м, н – х 100; б, к, л, и, о, п – х 200, г, д, е, з – х 400.

Таблица

Сравнительный анализ типов клеток грибов, грибных образований и клеток, участвующих в воспалении при риносинусите у пациентов

№ случая	Описание типов клеток грибов	Типы образований из клеток грибов	Наличие кристаллов и муцина в «грибном теле»	Типы клеток иммунной системы
1	Грибное тело 1: широкие гифы с редкими септами	Ложная ткань	Кристаллов и муцина нет	Нейтрофилы и эозинофилы
	Грибное тело 2: узкие гифы с частыми септами и широкие гифы с редкими септами	Ложная ткань, 2 мицетомы	Кристаллов и муцина нет	Нейтрофилы
	Грибное тело 3: узкие гифы с частыми септами	Ложная ткань	Кристаллов и муцина нет	Нейтрофилы и макрофаги
	Грибное тело 4: узкие гифы с частыми септами	Ложная ткань	Имеются ромбовидные кристаллы, муцина нет	Воспалительная реакция отсутствует
2	Узкие гифы с частыми септами и широкие гифы с редкими септами	Ложная ткань, 8 мицетом	Имеются ромбовидные кристаллы и муцин	Воспалительная реакция отсутствует
3	Узкие гифы с частыми септами и широкие гифы с редкими септами	Ложная ткань, 5 мицетом	Имеются игловидные кристаллы и муцин	Воспалительная реакция отсутствует

Второе и третье грибные образования были наиболее крупных размеров. Второе «грибное тело» имело вытянутую форму, неправильный контур (Рис. 1 б, 2 ж) и состояло из двух типов гиф. Основную его часть составляли тонкие (2-3 мкм), хаотично и плотно ориентированные гифы (Рис. 1 б) ярко-малинового цвета (Г-Э), имеющие довольно часто расположенные септы. По его периферии присутствовали две мицетомы разной формы (Рис. 2 в), состоящие из более широких (8-9 мкм) гиф с редкими септами. Одно из них имело полусферическую форму (Рис. 1 б) и было в плотном контакте с «грибным телом», другое имело меньшие размеры и веерообразную форму (Рис. 2 в). Оба эти скопления были окружены тонкими, беспорядочно и более рыхло локализованными септированными гифами, которые в целом составляли 2/3 «грибного тела», тогда как на долю мукормицета приходилась оставшая часть. Многочисленные нейтрофилы располагались лишь на небольшой протяженности периметра «грибного тела».

Третье «грибное тело», как и второе, имело слегка вытянутую форму (Рис. 1 в), ровный контур и состояло из тонких (2-3 мкм), слабоконтрастных, септированных, бледно-розовых гиф (PAS), расположенных плотно и хаотично относительно друг друга. Часть периферических гиф гриба была погружена в обильную тонко-фибрилярную слизь; формируемое ими скопление образовывалось из более рыхло ориентированных гиф (Рис. 1 в, стрелки). Примечательно, что по периферии описываемого «грибного тела» нам удалось выявить скопление из небольшого числа крупных (5,2 мкм), сильно оводненных конидий (Рис. 1 в) с высококонтрастными темно-коричневыми оболочками (Рис. 2 г). Иногда конидии формировали небольшие по протяженности цепочки. Так, по-видимому, привносятся извне в околоносовую пазуху конидии других видов мицелиальных грибов, последующий рост и развитие которых приводит к формированию «грибного тела» сложного анатомического строения. Наглядным при-

мером является третий тип «грибного тела», по периферии которого были выявлены скопления гиф, отличные от остальных. Нам представляется, что наличие слизи вокруг таких гиф, скорее всего, является показателем «неприятия» их основными гифами «грибного тела», необходимостью их пространственного обособления от выделяемых ими метаболитов. По 1/3 периметра данного «грибного тела» выявлены многочисленные нейтрофилы, перемежающиеся с редкими макрофагами (табл.).

Четвертое, самое мелкое по размерам, «грибное тело» (Рис. 1 г) имело округлую форму и четко очерченный периметр. Составляющие его гифы тонкие (2-3 мкм), септированные, плотно и хаотично ориентированные по типу ложной ткани, при окрашивании по методу PAS имели ярко-малиновый цвет. Особенностью анатомического строения данного «грибного тела» было наличие в нем небольшого числа (Рис. 1 г) кристаллических включений ромбовидной формы (Рис. 2 д, е) и варьирующих размеров (от 3,0-4,3 до 5,5-7,0 мкм), окрашенных в светло-розовый цвет, что делало их легко различимыми на срезах. На большом увеличении светового микроскопа можно было видеть, что кристаллы могли быть гомогенными (Рис. 2 д) либо состоять из плотно расположенных фрагментов (Рис. 2 е). Отметим, что вблизи данного «грибного тела» клетки иммунной системы отсутствовали.

По морфологии гиф можно предположить наличие в первом «грибном теле» данного случая только мукормицета, во втором – какого-то вида мицелиального гриба с тонкими септированными гифами и мукормицета, а в третьем – гиф и конидий неизвестного вида с тонкими и частыми септами и, наконец, только последнего – в четвертом. Признаков инвазии в данном случае не обнаружено.

Случай 2. Пациентке П. (31 год) был поставлен клинический диагноз «хронический левосторонний микотический верхнечелюстной синусит». В данном случае элементы слизистой оболочки околоносовой пазухи не были представлены.

В содержимом околоносовой пазухи обнаружено одно довольно крупное «грибное тело» слегка удлиненной формы (Рис. 3 а), имевшее асимметричное строение и волнистый контур. Основу его образовывала «ложная ткань», состоящая из плотно и хаотично расположенных тонких (2-3 мкм) септированных гиф. На одной из наиболее протяженных латеральных сторон «грибного тела» имело место меньшее по толщине и занимаемой площади рыхлое скопление (Рис. 3 а, 2), образованное из широких (6-8 мкм), хаотично ориентированных гиф с контрастными клеточными стенками и редкими септами. В содержимом «грибного тела», основанного из тонких гиф, имели место многочисленные скопления из одиночных кристаллов ромбовидной формы (2,0-4,0 x 5,6-7,0 мкм), расположенных в светлых полостях (Рис. 2 ж, з). По краям «грибного тела» были выявлены две группы из трех и пяти формирующихся мицетом разного диаметра, окруженные чехлом из рыхло ориентированных отмерших фрагментов гиф (Рис. 3 а, 2 ж). Гифы в мицетомах довольно широкие (6-7 мкм), хаотично и плотно локализуясь, без картин периферического апикального роста и снабженные редкими септами.

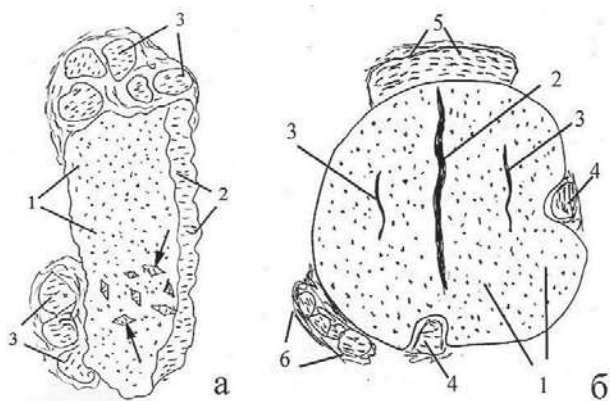


Рис. 3. Схема анатомического строения «грибного тела» околоносовой пазухи: второй (а) и третий (б) случаи.

Иногда в основании мицетом можно было наблюдать обильные скопления муцина (Рис. 2 и). Конидиальное спороношение в исследуемом материале отсутствовало. Выявленные различия в морфологии гиф «грибного тела», а также наличие мицетом позволяют допустить присутствие неизвестного вида мицелиального гриба и мукормицета, то есть смешанного типа синусита. Интересно отметить, что скопления гиф неизвестного вида мицелиального гриба и мукормицета находились в плотном контакте, но между собой не «смешивались». По глазмерной оценке 2/3 площади среза «грибного тела» была занята неизвестным видом мицелиального гриба с тонкими гифами и частыми септами, а остальная часть – мукормицетом.

Для «грибного тела» околоносовой пазухи анализируемого случая характерно асимметричное строение, обусловленное присутствием разных представителей грибов (неизвестный вид мицелиального гриба с тонкими гифами и частыми септами, а также мукормицет). Данные настоящей работы демонстрируют факт формирования мукормицетом мицетом специфического анатомического строения, что было показано нами ранее [1, 2]. Отсутствие спороношения и зрелых конидий, а также наличие формирующихся мицетом в анализируемом материале свидетельствует о «молодости» процесса колонизации грибами просвета околоносовой пазухи. Воспалительная реакция в данном случае не выявлена.

Случай 3. Пациентке С. (43 года) был поставлен диагноз «хронический правосторонний синусит верхнечелюстной пазухи». Фрагменты слизистой оболочки в анализируемом случае отсутствовали. В просвете околоносовой пазухи отмечали довольно массивное «грибное тело» сферической формы (Рис. 3 б). Основную часть его составляли плотно и хаотично расположенные тонкие (2-3 мкм), септированные гифы, формирующие ложную ткань (Рис. 2 л, 3 б, 1). По центру «грибного тела» проходила узкая, слегка извилистая полоса варьирующей толщины (30-40 мкм) (Рис. 2 л, стрелка, 3 б, 2), образуемая яркоокрашенными в малиновый цвет (PAS) широкими (7,0-9,0 мкм) гифами гриба, лишенными септ, рыхло и плотно расположенных относительно друг друга. Последние по особенностям строения были сходны с мукормицетами. Две более короткие и узкие (10-20 мкм) полосы сходного строения располагались на одинаковом расстоянии от центральной (Рис. 3 б, 3).

По краю «грибного тела» наблюдали два небольших

и неглубоких углубления разного диаметра, внутри которых находились одиночные мицетомы, состоящие из рыхло и хаотично расположенных скоплений с редкими септами грибных гиф, погруженных в слизь (Рис. 2 к, м, 3 б, 4). Также по периферии «грибного тела» отмечали одно скопление прямоугольной формы (Рис. 3 б, 5), содержащее аналогичные гифы (7,0-9,0 мкм). Снаружи его присутствовали рыхло и беспорядочно расположенные сильнодеформированные отмершие гифы. Пять мицетом разного диаметра (от 50 до 90 мкм) располагались по периферии «грибного тела» (Рис. 2 н, 3 б, 6). Две из них размещались в небольших углублениях (Рис. 3 б, 4), тогда как три – в один ряд и близи «грибного тела», но не находились в плотном контакте с ним (Рис. 3 б, 6). Мицетомы состояли из беспорядочно локализующихся широких (7,0-8,0 мкм) гиф с редкими септами. Они со всех сторон были окружены довольно широкой обкладкой из сильнодеформированных отмерших клеток гиф. Иногда в самой толще «грибного тела» выявляли светлые участки разного размера, содержащие умеренной электронной плотности гомогенный муцин (Рис. 2 о, п). Изредка в муцине можно было наблюдать скопления из небольшого числа мелких, одиночных, светлых, игловидной формы кристаллов (Рис. 2 п). Воспалительная реакция в описываемом случае отсутствовала.

Околоносовая пазуха представляет собой влажное и темное место, по температурным условиям благоприятное для развития грибов. Сюда токами воздуха приносятся конидии разных видов грибов, последующий рост и развитие которых приводит к формированию так называемого «грибного тела», для которого, как показывают наши исследования, характерно разнообразное анатомическое строение. Обычно в околоносовой пазухе формируется одно «грибное тело» [1-4]. В первом случае настоящего исследования был выявлен редкий случай образования в околоносовой пазухе четырех типов анатомического строения «грибного тела», в двух других – по одному довольно крупному. Особенности его анатомического строения у первого пациента («грибное тело» 2 и 3), а также во втором случае, где оно состояло из разных типов гиф, заключаются в следующем: скопления широких гиф, предположительно мукормицета, – это более молодая часть, привнесенная извне. В третьем случае данного исследования и двух ранее нами приведенных [1, 2] с другим типом анатомического строения «грибного тела», обусловленного присутствием узких и широких гиф, основной остов был образован узкими септированными гифами, а широкие гифы мукормицета пронизывали его в виде узких малочисленных или многочисленных скоплений слегка извилистой формы. Формирование такого анатомического типа «грибного тела», по видимому, происходит при попадании в околоносовую пазуху «инокулюма» смешанного типа, составленного из конидий разных видов мицелиальных грибов, один из которых был мукормицетом. При изучении анатомического строения содержимого пазухи пациентов с микотическим риносинуситом [данные настоящего исследования, 1-4] выявлено, что в содержимом околоносовой пазухи обычно присутствует совершенно нетипичное для условий культуры образование – ложная ткань, состоящая из плотно адгезированных и хаотично ориентированных гиф мицелиального гриба с тон-

кими септированными гифами. Иногда, в случае наличия спороношения и/или аспергиллем, можно определить принадлежность этих грибов к аспергиллам [1, 2]. Уникальным представляется в 1 случае данного исследования первое «грибное тело», состоящее только из широких гиф мукормицета. Несмотря на довольно компактное и хаотичное расположение гиф, здесь не формируется истинно ложная ткань, гифы гриба локализируются компактно благодаря наличию фибрина. Формирование истинно ложной ткани возможно ввиду наличия снаружи клеточной стенки гиф некоторых видов мицелиальных патогенных грибов так называемого «внеклеточного матрикса». До сих пор последний был выявлен для гиф субстратного мицелия и вегетативных гиф тканевых форм некоторых видов патогенных грибов, относящихся к родам *Aspergillus*, *Scedosporium* и *Pseudallescheria* [5-13]. Интересно, что для ранее изученных нами патогенных видов грибов родов *Trichophyton* [14, 15] и *Fusarium* [16] внеклеточный матрикс для гиф мицелия культуральных форм не был характерен. Мы считаем, что мукормицеты не способны формировать ложную ткань из-за отсутствия снаружи клеточной стенки гиф мицелия культуральных и тканевых форм гриба именно внеклеточного матрикса [17]. Возможно, поэтому они не образуют массивных скоплений в грибном теле, а лишь узкие, слегка извилистые, редкие [1, 2] или многочисленные полосы (третий случай настоящего исследования). Таким образом, мукормицеты не способны формировать в околоносовой пазухе ригидные и устойчивые к не-

благоприятным внешним условиям образования, а в ассоциации с другими видами мицелиальных грибов образуют «полосатые грибные тела». Формируемые ими мицетомы существенным образом отличаются от аспергиллем отсутствием радиального и маргинального апикального роста. Другой особенностью является то, что гифы в мицетомах мукормицетов располагаются плотно и хаотично. Мы полагаем, что рост мицетом такого анатомического строения осуществляется ввиду отсутствия у составляющих их гиф типичных для мицелиальных грибов ригидных септ путем одновременного роста растяжения их клеточных стенок.

В трех из описанных случаев в составе «грибного тела» обнаружили кристаллические включения (табл.) и только в одном из них – наблюдали редкие мелкие игловидные кристаллы, отдаленно напоминающие кристаллы Шарко-Лейдена [18], что не исключает присутствие аллергического компонента. Однако характерные для аллергического типа риносинусита многочисленные эозинофилы в этом материале отсутствовали.

Все три описанных случая представляют собой неинвазивный тип риносинусита. В изученных «грибных телах» элементы спороношения не выявлены, что может быть показателем «молодости» инфекционного процесса. Пока остается открытым вопрос о том, возможно ли спороношение в области мицетом мукормицетов и каков характер его топографической локализации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авдеенко Ю.Л., Степанова А.А., Митрофанов В.С. и др. Гистологическое исследование микотического синусита. Проблемы медицинской микологии. 2017; 19 (3): 32-40. [Avdeenko Y.L., Stepanova A.A., Mitrofanov V.S. i dr. Gistologicheskoe issledovanie mikoticheskogo sinusita. Problemy medicinskoj mikologii. 2017; 19 (3): 32-40 (in Russ)].
2. Степанова А.А., Авдеенко Ю.Л., Подковальников С.Л. Сравнительный гистологический анализ двух клинических случаев микотического риносинусита. Проблемы медицинской микологии. 2018; 20 (1): 33-39. [Stepanova A.A., Avdeenko Y.L., Podkovaľnikov S.L. Sravnitel'nyj gistologicheskij analiz dvuh klinicheskikh slučaeв mikoticheskogo rinosinusita. Problemy medicinskoj mikologii. 2018; 20 (1): 33-39 (In Russ)].
3. Степанова А.А., Авдеенко Ю.Л., Подковальников С.Л. Гистологическое изучение микотического риносинусита. Сборник материалов 5-й отчетной сессии научных подразделений СЗГМУ им. И.И. Мечникова «Фундаментальные исследования в современной медицине: достижения и перспективы». СПб., 2018: 33-34. [Stepanova A.A., Avdeenko Y.L., Podkovaľnikov S.L. Gistologicheskoe izučenie mikoticheskogo rinosinusita. Sbornik materialov 5-j otchetnoj sessii nauchnyh podrazdelenij SZGMU im. I.I. Mechnikova "Fundamental'nye issledovaniya v sovremennoj medicine: dostizheniya i perspektivy". SPb., 2018: 33-34 (In Russ)].
4. Степанова А.А., Авдеенко Ю.Л., Подковальников С.Л. Микроскопическое изучение микотического риносинусита. Успехи мед. микологии, Тез. докл. конф., том XVIII. М., 2018: 423. [Stepanova A.A., Avdeenko Y.L., Podkovaľnikov S.L. Mikroskopicheskoe izučenie mikoticheskogo rinosinusita. Uspekhi med. mikologii, Tez. dokl. konf., tom XVIII. M., 2018: 423 (In Russ)].
5. Степанова А.А., Сеницкая И.А., Авдеенко Ю.Л. Субмикроскопическое изучение клеток вегетативного мицелия *Aspergillus fumigatus* Fres. Проблемы медицинской микологии. 2004; 6 (3): 34-40. [Stepanova A.A., Sinickaya I.A., Avdeenko Y.L. Submikroskopicheskoe izučenie kletok vegetativnogo miceliya *Aspergillus fumigatus* Fres. Problemy medicinskoj mikologii. 2004; 6 (3): 34-40 (In Russ)].
6. Степанова А.А., Босак И.А., Сеницкая И.А. Цитологическое исследование *Aspergillus fumigatus* Fres. в легких мышей. Проблемы медицинской микологии. 2013; 15 (1): 52-58. [Stepanova A.A., Bosak I.A., Sinickaya I.A. Citologicheskoe issledovanie *Aspergillus fumigatus* Fres. v legkih myshej. Problemy medicinskoj mikologii. 2013; 15 (1): 52-58 (In Russ)].
7. Stepanova A.A., Vasilyeva N.V., Zhang F. et al. Electronmicroscopic investigations of invasive aspergillosis, caused with *Aspergillus fumigatus*. Проблемы медицинской микологии. 2015; 17 (3): 38-41. [Stepanova A.A., Vasilyeva N.V., Zhang F. et al. Electronmicroscopic investigations of invasive aspergillosis, caused with *Aspergillus fumigatus*. Problemy medicinskoj mikologii. 2015; 17 (3): 38-41 (In Russ)].
8. Stepanova A.A., de Hoog S., Vasilyeva N.V. Intra- and interspecific diversity of ultrastructural markers in *Scedosporium*. Fungal Biology. 2016; 120: 147-154.
9. Степанова А.А., Васильева Н.В., Чжан Ф. и др. Ультраструктурное исследование клеток вегетативного мицелия *Aspergillus candidus* Link, выращенных in vitro. Проблемы медицинской микологии. 2016; 18 (2): 23-27. [Stepanova A.A., Vasilyeva N.V., Chzhan F. i dr. Ultrastrukturnoe issledovanie kletok vegetativnogo miceliya *Aspergillus candidus* Link, vyrashchennyh in vitro. Problemy medicinskoj mikologii. 2016; 18 (2): 23-27 (In Russ)].

10. Степанова А.А., Васильева Н.В., Босак И.А. и др. Особенности строения *Aspergillus fumigatus* при экспериментальном аспергиллезе у мышей. Проблемы медицинской микологии. 2016; 18 (4): 40-52. [Stepanova A.A., Vasil'eva N.V., Bosak I.A. i dr. Osobennosti stroeniya *Aspergillus fumigatus* pri ehksperimental'nom aspergilleze u myshej. Problemy medicinskoj mikologii. 2016; 18 (4): 40-52 (In Russ)].
11. Stepanova A.A., Vasilyeva N.V., Bogomolova T.S., et al. Cytological study of the in vitro growing cells of vegetative mycelium of *Scedosporium apiospermum*. Problems in medical mycology. 2017; 19 (1): 24-30.
12. Stepanova A.A., Yamaguchi M.M., Chibana H., et al. Comparative ultrastructural analysis of the in vitro growing hyphal cells of *Scedosporium aurantiacum*. Problems in medical mycology. 2017; 19 (3): 18-25.
13. Степанова А.А., Васильева Н.В., Чжан Ф. и др. Ультраструктурная организация *Aspergillus* spp. в тканях легких пациентки. Проблемы медицинской микологии. 2018; 20 (2): 29-39. [Stepanova A.A., Vasil'eva N.V., Chzhan F. i dr. Ul'trastrukturnaya organizaciya *Aspergillus* spp. v tkanyah legkih pacientki. Problemy medicinskoj mikologii. 2018; 20 (2): 29-39 (In Russ)].
14. Савицкая Т.И., Васильева Н.В., Мартынов А.А. и др. Электронно-микроскопическое изучение выращенных in vitro клеток *Trichophyton rubrum* (Castell.) Semon. Проблемы медицинской микологии. 2007; 9 (1): 20-25. [Savickaya T.I., Vasil'eva N.V., Martynov A.A. i dr. Elektronno-mikroskopicheskoe izuchenie vyrashchennyh in vitro kletok *Trichophyton rubrum* (Castell.) Semon. Problemy medicinskoj mikologii. 2007; 9 (1): 20-25 (In Russ)].
15. Степанова А.А. Ультраструктура клеток *Trichophyton violaceum* Sabour. ex E. Bodin, выращенных на агаре Чапека. Проблемы медицинской микологии. 2010; 12 (2): 36-42. [Stepanova A.A. Ul'trastruktura kletok *Trichophyton violaceum* Sabour. ex E. Bodin, vyrashchennyh na agare Chapeka. Problemy medicinskoj mikologii. 2010; 12 (2): 36-42 (In Russ)].
16. Степанова А.А., Гагкаева Т.Ю. Цитологическое изучение клеток вегетативного мицелия *Fusarium oxysporum* Scltdl. Материалы международной научной конференции «Проблемы микологии и фитопатологии в XXI веке». СПб., 2013: 253-254. [Stepanova A.A., Gagkaeva T.Y. Citologicheskoe izuchenie kletok vegetativnogo miceliya *Fusarium oxysporum* Scltdl. Materialy mezhdunarodnoj nauchnoj konferencii "Problemy mikologii i fitopatologii v XXI veke". SPb., 2013: 253-254 (In Russ)].
17. Степанова А.А., Хостелиди С.Н., Аравийский Р.А. и др. Электронно-микроскопическое исследование *Lichtheimia* sp. in vivo и in vitro. Проблемы медицинской микологии. 2012; 14 (4): 55-61. [Stepanova A.A., Hostelidi S.N., Aravijskij R.A. i dr. Elektronno-mikroskopicheskoe issledovanie *Lichtheimia* sp. in vivo i in vitro. Problemy medicinskoj mikologii. 2012; 14 (4): 55-61 (In Russ)].
18. Granville L., Chirala M., Cernoch P., et al. Fungal sinusitis: histologic spectrum and correlation with cultures. Hum. Pathol. 2004; 35 (4): 474-481.

Поступила в редакцию журнала: 02.11.2018

Рецензент: Т.С. Богомолова



МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ СОЗДАНИЯ КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ КОСТНОГО ЦЕМЕНТА С ПРОЛОНГИРОВАННЫМ АНТИМИКРОБНЫМ ДЕЙСТВИЕМ В ОТНОШЕНИИ ГЕНТАМИЦИН- УСТОЙЧИВЫХ *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS*

^{1,2}Афиногорова А.Г. (в.н.с., руководитель испытательного лабораторного центра, профессор кафедры)*, ³Квиникадзе Г.Э. (зав. отделением), ¹Спиридонова А.А. (аспирант), ²Афиногенов Г.Е. (профессор кафедры), ³Линник С.А. (профессор кафедры), ²Мадай Д.Ю. (зав. кафедрой)

¹ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера;

² Санкт-Петербургский государственный университет (кафедра челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии); ³ Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

©Коллектив авторов, 2018

Разработка и внедрение спейсера на основе костного цемента с длительным антимикробным эффектом остается актуальной проблемой при выполнении операции по двухэтапному протезированию крупных суставов. Вытяжки из образцов композиций костного цемента с гентамицином, ванкомицином, повидарголом (нанокластеры серебра) и высокомолекулярным поливинилпирролидоном (ПВП) тестировали на цитотоксичность на культуре клеток фибробластов кожи эмбриона человека и антимикробный эффект (диско-диффузионным и количественным чашечно-суспензионным методами) в отношении *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990 (чувствительного к гентамицину) и клинического штамма *S. epidermidis* 5027207 (устойчивого к гентамицину, МИК 310 мкг/мл). Вытяжки с гентамицином, ванкомицином и 3% и 5% повидарголом оказывали цитотоксический эффект на фибробласты в отличие от вытяжек, содержащих повидаргол и ПВП. В отношении чувствительного штамма стафилококка антимикробный эффект контрольной вытяжки с гентамицином сохранялся на уровне требований EUCAST-2018 по уровню чувствительности *S. epidermidis* к гентамицину (зона задержки > 18 мм) до 2 месяцев. Вытяжки с 1% повидарголом и 1% или 8% ПВП оказывали антимикробное действие в период до 292 дней, когда зоны задержки роста тест-штамма составили 11,3 ± 0,7 мм и 12,3 ± 0,3 мм соответственно. В отношении резистентного к гентамицину клинического штамма *S. epidermidis* 5027207 вытяжка из костного цемента с гентамицином не эффективна. При добавлении ванкомицина антимикробное действие наблюдали до 15 дня. Вытяжки с повидарголом и ПВП оказывали пролонгированный антимикробный эффект на протяжении 292 дней наблюдения. При оценке эффективности действия антимикробной композиции, содержащей антисептики, требования EUCAST-2018 не применимы. Мы считаем, что наличие любой зоны задержки роста резистентного к антибиотикам микроорганизма свидетельствует о проявлении антимикробной активности композиции в отношении него. В количественном чашечно-суспензионном тесте показано снижение уровня микробной популяции чувствительного и резистентного изолятов стафилококка на 3 log₁₀ в вытяжках с повидарголом и ПВП на 292 день. В работе оценена перспективность использования серебросодержащего антисептика,

разрешенного для местного применения в клинике, и высокомолекулярного поливинилпирролидона как компонента детоксикации и пролонгации антимикробного эффекта композиции на основе костного цемента.

Ключевые слова: костный цемент, гентамицин-резистентный стафилококк, нанокластеры серебра, высокомолекулярный поливинилпирролидон

MICROBIOLOGICAL EVALUATION OF THE COMPOSITIONS BASED ON BONE CEMENT WITH PROLONGED ANTIMICROBIAL ACTION AGAINST GENTAMICIN- RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS*

Afinogenova A.G.^{1,2} (leading, scientific collaborator, head of testing laboratorial centre, professor of the department), ³Kvinikadze G.E. (head of the clinical department), Spiridonova A.A.¹ (graduate student), Afinogenov G.E.² (professor of the department), Maday D.Yu.² (head of the department)

¹ St. Petersburg Pasteur Institute; ² St. Petersburg State University (Surgical Dentistry Department); ³ North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia

©Collective of authors, 2018

The development and implementation of a bone cement-based spacer with a long-lasting antimicrobial effect remains an urgent problem when performing an operation on two-stage prosthetics of large joints. Extracts from samples of bone cement compositions with gentamicin, vancomycin, Poviargol (nanoclusters of silver) and high molecular weight polyvinylpyrrolidone (PVP) were tested for cytotoxicity in a culture of human embryo skin fibroblast cells and antimicrobial effect (disk diffusion and quantitative suspension methods) against *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990 (sensitive to gentamicin) and clinical isolate *S. epidermidis* 5027207 (resistant to gentamicin, MIC 310 µg/ml). Extracts with gentamicin, vancomycin and 3% and 5% poviargol had a cytotoxic effect on fibroblasts in contrast to extracts containing poviargol and PVP. With respect to the sensitive strain of *Staphylococcus*, the antimicrobial effect of the control extract with gentamicin remained at the level of the requirements of EUCAST-2018 in the level of sensitivity of *S. epidermidis* to gentamicin (delayed zone > 18 mm) for up to 2 months. Samples with 1% poviargol and 1% or 8% PVP had an antimicrobial effect in the period up to 292 days, when the growth zones of the test strain were 11,3±0,7 mm and 12,3±0,3 mm, respectively. In relation to the resistant clinical isolate *S. epidermidis* 5027207, the extract from bone cement with gentamicin is not effective. When vancomycin was added, the antimicrobial effect was observed up to 15 days. Extracts with poviargol and PVP had a prolonged antimicrobial effect during 292 days of observation. When evaluating the effectiveness of an antimicrobial composition containing antiseptics, the requirements of EUCAST-2018 are not applicable. We believe that the presence of any zone of growth inhibition of an antibiotic-resistant microorganism indicates the manifestation of the antimicrobial activity of the composition against it. The quantitative suspension test showed a decrease in the level of the microbial population of both sensitive and resistant *Staphylococcus* by 3 log₁₀ in extracts with poviargol and PVP on day 292. The prospect of using silver-containing antiseptic and high-molecular polyvinylpyrrolidone as a component of detoxification and prolongation of the antimicrobial effect of the composition based on bone cement was evaluated.

Key words: bone cement, gentamicin-resistant staphylococcus, silver nanoclusters, high molecular weight polyvinylpyrrolidone

* Контактное лицо: Афиногорова Анна Геннадьевна, e-mail: spbtestcenter@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Двухэтапная замена эндопротеза является наиболее эффективной формой лечения для большинства больных с параэндопротезной инфекцией. Суть метода заключается в том, что после удаления всех компонентов эндопротеза, санации костных структур и параартикулярных тканей устанавливают временный лечебный эндопротез (спейсер из костного цемента, содержащего антибиотик) [1]. После купирования инфекционного процесса спейсер заменяют на постоянный ревизионный протез. При этом сами ревизионные вмешательства увеличивают риск гнойных осложнений в 2-5 раз. Бактериальная колонизация имплантата может осуществляться через два альтернативных механизма. Первый – путём прямого неспецифического взаимодействия между бактерией и непокрытой белками искусственной поверхностью «хозяина», за счёт электростатического поля, поверхностного натяжения, сил Ван-дер-Ваальса, гидрофобности и водородных связей. Показано, что существует избирательная адгезия микробов к имплантату в зависимости от материала, из которого он выполнен. Например, адгезия штаммов *Staphylococcus epidermidis* лучше происходит к полимерным частям эндопротеза, а штаммов *S. aureus* – к металлическим [2]. В отечественном эндопротезировании практикуют индивидуальный подход к лечению параэндопротезной инфекции у пациента, исходя из каждого конкретного случая. В настоящее время нет общего понимания о продолжительности оптимального интервала между выполнением первого и второго этапов ревизионного протезирования, время которого составляет от 6 недель до 1 года [3, 4]. В период до второго этапа эндопротезирования хирурги трижды в месяц после установки спейсера выполняют осмотр пациентов, включающий оценку локального статуса, данных лабораторных исследований (СОЭ, С-реактивный белок), пункцию оперированного сустава с последующим бактериологическим исследованием пункта [5]. В случае недостаточного антимикробного эффекта установленного спейсера возможна манифестация воспалительного процесса, что удлиняет срок выполнения реэндопротезирования.

Основой лечебного эффекта спейсеров служит постепенный выход антибиотика в окружающие ткани в течение длительного времени, достаточного для подавления инфекционного процесса в мягких и костных тканях, а также сохранения функций сустава [6]. Однако есть исследования, в которых показано, что длительность антимикробного действия костного цемента с гентамицином, традиционно используемого при установке спейсера, составляет 56 дней [7, 8]. Отметим, что только в единичных исследованиях указаны тест-штаммы микроорганизмов, в отношении которых оценивали антимикробное действие спейсеров с различными антибиотиками. Кимайкиной О.В. с соавт. (2018) диско-диффузионным методом показано, что активность вытяжек из костного цемента с гентамицином и ванкомицином в отношении *S. epidermidis* и *Propionibacterium acnes* в течение 1 месяца сохранялась на уровне требований EUCAST-2018 по показателю чувствительности к гентамицину (зона задержки роста ≥ 18 мм); эффект в отношении *S. epidermidis* наблюдали и через 3,5 месяца, но зона задержки роста тест-штамма составляла 11-12,5 мм, что меньше требований EUCAST-2018 [9].

В связи с этим большую актуальность приобретает применение костного цемента с пролонгированным антимикробным действием, который эффективен в течение не менее 6 месяцев, в том числе в отношении микроорганизмов, резистентных к гентамицину. В настоящее время для пролонгации и усиления бактерицидного эффекта в различных изделиях медицинского назначения используют высокомолекулярный поливинилпирролидон (ПВП) и антисептик повидон (нанокластеры серебра), малотоксичный и эффективный против широко спектра микроорганизмов, в том числе антибиотикоустойчивых [10].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Применяли следующие смеси: (1) порошок костного цемента Synicem 1G (Synimed, Франция) 40 г с содержанием гентамицина 1,25%; (2) порошок костного цемента Synicem 1G 40 г с содержанием гентамицина 1,25% и ванкомицина (Эдидин) 10%; (3) порошок костного цемента Synicem 1G 40 г с содержанием гентамицина 1,25%, повидона 5%; (4) порошок костного цемента Synicem 1G 40 г с содержанием гентамицина 1,25%, повидона 3%; (5) порошок костного цемента Synicem 1G 40 г с содержанием гентамицина 1,25%, повидона 1%; ПВП 1%; (6) порошок костного цемента Synicem 1G 40 г с содержанием гентамицина 1,25%, повидона 1%, ПВП 8%. При добавлении жидкого пластификатора к соответствующей смеси на основании инструкции фирмы-производителя получали пластичную массу, в процессе полимеризации которой формировали полусферы весом 1 г на 96-луночных полистироловых планшетах. Вытяжки из образцов композиций получали стандартным методом согласно требованиям, изложенным в [11].

Антимикробную активность вытяжек оценивали методом диффузии в агар [12]. Объем 100 мкл вытяжки помещали в лунку на чашке Петри с агаром Мюллера-Хинтона, предварительно засеянной инокулятом микроорганизмов $5 \cdot 10^5$ КОЕ/мл. В качестве тест-штаммов тестировали *S. epidermidis* ATCC 14990 /S/ (чувствительный к гентамицину) и клинический изолят *S. epidermidis* 5027207 /R/ (устойчивый к гентамицину, МИК – 310 мкг/мл [12]). Посев вытяжек проводили каждые 3 суток в течение 3 месяцев, а затем – каждые 7 суток в течение 6 месяцев. После очередного посева меняли стерильный 0,9% физиологический раствор в емкостях с цементом для получения очередной вытяжки.

В период эксперимента, когда диско-диффузионным методом получали величины зон задержки роста обоих тест-штаммов ниже уровня чувствительности к гентамицину по EUCAST-2018 (≤ 18 мм), дополнительно проводили количественный тест чашечно-суспензионным методом [13] с целью оценки пролонгированного антимикробного действия вытяжек из образцов костного цемента с антисептиками и ПВП в отношении гентамицин-устойчивого изолята *S. epidermidis* 5027207, микробная нагрузка которого составила 10^3 КОЕ/мл. Такой уровень КОЕ тест-штамма достаточен для оценки эффективности антисептиков, которые должны снижать уровень микробной популяции на $2 \log_{10}$ [14].

Критериями оценки безопасности антимикробного костного цемента выбраны: общетоксическое дей-

стве, раздражающее действие на кожу и слизистые оболочки (*in vivo*), а также морфологическая оценка состояния монослоя клеток фибробластов человека в культуре (*in vitro*).

Работа по изучению безопасности вытяжек из образцов костного цемента *in vivo* выполнена на следующих лабораторных животных: на 24 мышах линии SHR массой 18,0-20,0 г мужского пола, на 15 морских свинок альбиносах обоего пола массой 250,0-300,0 г, на 12 кроликах самцах породы «Шиншилла» массой 2,5-3,0 кг. Экспериментальных животных содержали и использовали в соответствии с требованиями нормативных документов [15].

В предварительных опытах изучали *острую токсичность* исследуемых образцов по методу Дейхмана и Ле Бланка на мышах массой 18,0-20,0 г [16].

Общетоксическое действие анализировали на мышах по данным подострой токсичности. Животные были распределены на 6 групп, каждая по 6 особей. Мышам 1-й (контрольной) группы 3-хкратно энтерально с помощью желудочного зонда вводили по 0,5 мл физиологического раствора; животным в опытных группах – по 0,5 мл вытяжки из соответствующего испытуемого образца костного цемента с антимикробными компонентами. В ходе эксперимента оценивали: общее состояние, поведение животных, их двигательную активность, потребление воды и корма, состояние кожных покровов и слизистых оболочек. После 14-дневного наблюдения животных выводили из эксперимента. Состояние внутренних органов исследовали макроскопически.

Местно-раздражающее действие на неповрежденные кожные покровы изучали при воздействии тестируемых вытяжек на свободную от волосяного покрова кожу морских свинок. В опыте использовали 5 морских свинок белой масти. За сутки до опыта животным в области спины депилировали участок кожи размером 2,5×2,5 см. Ежедневно в течение 3 дней на них наносили по 2 мл каждого испытуемого раствора. Время экспозиции – 3 часа. Препараты смывали физиологическим раствором в конце срока наблюдения и визуально оценивали состояние кожной реакции согласно следующим критериям: наличие гиперемии, отека, эрозий, язв, шелушения. Местно-раздражающее действие вытяжек анализировали по Классификации опасности по выраженности местно-раздражающих свойств дезинфицирующих средств на коже [16].

Раздражающее действие на слизистые оболочки глаз изучали на кроликах породы Шиншилла массой 2,5-3,0 кг. В каждой группе (по 4 особи) соответствующую тестируемую вытяжку вносили по 1-2 капли в конъюнктивальный мешок левого глаза кроликов при пережимании слезно-носового канала на 1 минуту. Второй глаз животного служил контролем, куда вводили 1-2 капли физиологического раствора. Наблюдение за состоянием глаз проводили в течение 6 дней. Местно-раздражающее действие вытяжек оценивали по Классификации по выраженности раздражающих свойств дезинфицирующих средств на глаза [16].

Для изучения *цитотоксического действия* тестируемых препаратов осуществляли совместную инкубацию фибробластов с соответствующей вытяжкой в 96-луночных планшетах (12 лунок на каждый препарат) в питательной среде Игла при 37 °С в течение 24

часов. Затем клетки монослоя отмывали от вытяжки многократной сменой среды Игла, фиксировали 96° этиловым спиртом, окрашивали по Романовскому-Гимза и исследовали под микроскопом. Для оценки острого цитотоксического действия (ЦТД) использовали 5-балльную шкалу FDA, США: 0 баллов – отсутствие цитотоксического действия, 1 балл – слабое токсическое действие (20-25% лизированных клеток), 2 балла – мягкое токсическое действие (50% гибели клеток), 3 балла – умеренное токсическое действие (70-75% клеточного монослоя содержат округлые и/или лизированные клетки), 4 балла – тяжелое токсическое действие (100% деструкция клеточного монослоя). В каждом опыте оценивали не менее 100 клеток. Согласно данной шкале тестируемые препараты отвечают требованиям безопасности, если во всех опытных лунках степень ЦТД не более 1 балла [17].

Все исследования проведены в повторях не менее 3 и обработаны с использованием t-критерия Стьюдента с определением средней арифметической величины и квадратической ошибки средней внутри каждой группы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При введении каждой из 6 вытяжек в желудок мышей гибели животных не отмечали в течение срока наблюдения (3 дня). Таким образом, согласно ГОСТ 12.1.007-76 [16], тестируемые вытяжки соответствовали 4 классу малоопасных веществ при введении в желудок, и концентрации действующих веществ составляли более 2500 мг/кг.

Показано, что 3-х дневное энтеральное введение исследуемых вытяжек не вызывало клинических признаков интоксикации во всех группах животных: их общее состояние, поведение, двигательная активность, режим потребления и корма, а также внешний вид шерсти, кожных покровов и слизистых оболочек оставались в пределах физиологической нормы. После выведения животных из эксперимента на вскрытии: ткани в месте введения, внутренние органы, регионарные лимфатические узлы у опытных мышей в пределах физиологической нормы и контроля, весовые коэффициенты внутренних органов не имели статистически значимых отличий от аналогичных показателей в контроле.

При однократном и многократном нанесении тестируемых вытяжек на кожу морских свинок не отмечали признаков воспаления и раздражения кожи (суммарно 0 баллов). Таким образом, показано, что вытяжки из всех образцов антимикробного костного цемента по влиянию на кожу можно отнести к 4 классу малоопасных веществ.

При введении всех вытяжек в конъюнктивальный мешок глаз кроликов во всех случаях наблюдали небольшой отек (0,5 балла) и эритему (0,5 балла). Полученные данные свидетельствуют о том, что тестируемые вытяжки оказывали слабое раздражающее действие на слизистые оболочки глаза и относились к 4 классу опасности.

По результатам оценки воздействия *in vitro* вытяжек из композиций костного цемента на культуру клеток фибробластов кожи человека в присутствии 10% эмбриональной бычьей сыворотки установлено, что вытяжки (1-2) из образцов костного цемента с гентамицином и ванкомицином через 24 часа оказывали по-

вреждающее действие на монослой клеток фибробластов кожи человека, в каждом случае 75% клеток были разрушены, степень ЦТД составила 3 балла. Вытяжки с 3% и 5% повииаргола (3-4) разрушали клетки монослоя на 50%, степень ЦТД – 2 балла. При воздействии вытяжек из образцов 5-6, содержащих гентамицин, повииаргол и ПВП, через 24 часа наблюдали сохранение монослоя фибробластов, все клетки и ядра сохраняли свою форму и целостность, степень ЦТД составила 0 баллов.

Можно предположить, что отсутствие цитотоксического действия вытяжки из антимикробных композиций (5-6) связано с присутствием в них полимера ПВП, обладающего собственной сорбционной и анти-токсической активностью [18, 19].

Результаты сравнительной оценки антимикробной активности вытяжек из различных образцов костного цемента представлены в таблице.

Из данных таблицы 1 видно, что в отношении чувствительного штамма *S. epidermidis* ATCC 14990 антимикробный эффект контрольной вытяжки (1) сохранялся на уровне требований EUCAST-2018 по уровню чувствительности *S. epidermidis* к гентамицину (зона задержки > 18 мм) в течение 42 суток. Таким образом, определена эффективность гентамицина в костном цементе в точке, переходной от его бактерицидного действия к отсутствию такового (точка нарушения предела чувствительности). Вытяжка с ванкомицином (2) оказывала эффект на уровне контрольной вытяжки только с гентамицином до 42 суток (зона задержки роста – 18,0±0,7 мм). При действии вытяжек с 5% (3) и 3% (4) повииарголом наблюдали наличие зоны задержки роста чувствительного тест-штамма в течение 258 суток. Вытяжки (5) и (6) с повииарголом и ПВП оказывали антимикробное действие в период до 292 дней, когда зоны задержки роста тест-штамма составили 11,3±0,7 мм и 12,3±0,3 мм соответственно. Когда при действии вытяжек с антисептиком (3-6) зоны задержки роста тест-штамма составляли менее 18 мм, в чашечно-суспензионном тесте выявили снижение уровня микробной популяции стафилококка на 2-3 log₁₀.

В отношении резистентного к гентамицину клинического изолята *S. epidermidis* 5027207 вытяжка из контрольного костного цемента (1) не эффективна. При добавлении ванкомицина (2) антимикробное действие отмечали до 15 дня, но на уровне ниже требований EUCAST-2018 по уровню чувствительности *S. epidermidis* к гентамицину (зона задержки роста – 10,0±0 мм). Вытяжки с повииарголом и с ПВП (3-6) оказывали пролонгированный антимикробный эффект на протяжении 292 дней наблюдения.

При оценке эффективности действия антимикробной композиции, содержащей антисептики, требования EUCAST-2018 не применимы. Мы считаем, что наличие любой зоны задержки роста резистентного к антибиотику микроорганизма свидетельствует о проявлении антимикробной активности композиции в отношении него. Однако эффективные антисептики должны снижать уровень микробной популяции на 2 log₁₀ [14]. В связи с этим проведен количественный тест чашечно-суспензионным методом по оценке снижения уровня микробной популяции резистентного изолята в исследуемых вытяжках (3-6), когда на 292 день снижение уровня микробной контаминации в каждом случае составило 2-3 log₁₀.

На рисунке представлены результаты количественного теста, где слева наблюдали отсутствие роста резистентного штамма стафилококка при воздействии вытяжки (5) с 1% повииарголом и 1% ПВП на срок 292 день, когда диско-диффузионным методом получена зона задержки роста 9,7±0,3 мм. Справа на тот же срок на чашках показан рост клинического изолята *S. epidermidis* 5027207 при воздействии контрольной вытяжки (1) из костного цемента с гентамицином.

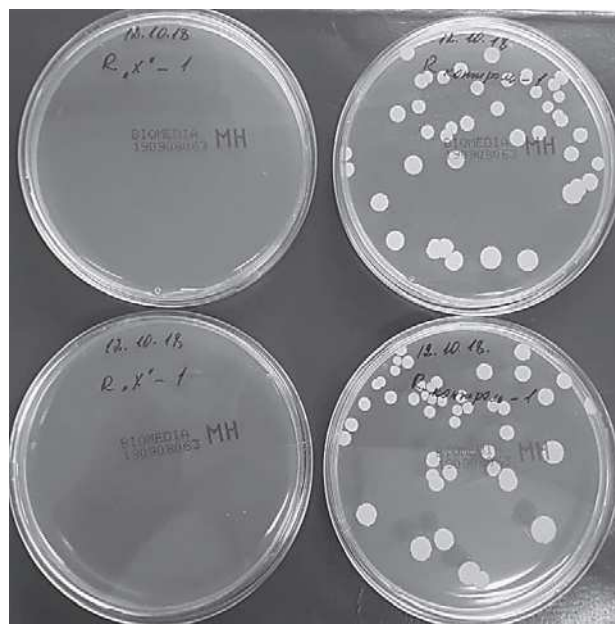


Рис. Результаты действия вытяжек из костного цемента с гентамицином (справа) и из костного цемента с гентамицином, 1% повииарголом и 1% ПВП (слева) в отношении резистентного к гентамицину клинического штамма *S. epidermidis* на 292 день, количественный чашечно-суспензионный тест, исходная микробная нагрузка 10³ КОЕ/мл.

Таблица

Сравнительная оценка антимикробной активности вытяжек из образцов костного цемента

Срок испытания вытяжки (сутки)	Зона задержки роста тест-штаммов под воздействием соответствующей вытяжки, мм (n=3)											
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> /SI ¹						<i>Staphylococcus epidermidis</i> /R/					
	Номер соответствующей вытяжки (описание по тексту)						Номер соответствующей вытяжки (описание по тексту)					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
3	23,3±1,7	26,3±1,0	31,0±0,7	30,7±0,3	33,7±1,0	37,3±0,7	0	24,3±0,3	28,7±0,3	29,7±0,3	31,7±0,3	36,7±0,7
15	19,7±1,0	24,5±1,0	29,3±0,3	30,0±0,7	31,3±0,7	37,3±0,34	0	10,0±0	27,7±0,3	29,0±0	30,0±0,7	33,7±0,7
30	19,0±0,7	23,0±0,7	29,0±0,7	21,7±1,37	23,0±1,71	34,7±1,0	NA	0	26,7±0,7	21,7±1,4	23,0±0,7	33,0±0,7
42	18,3±1,0	18,0±0,7	24,0±0,7	20,3±1,0	21,0±1,4	34,7±0,3	NA	0	22,0±0,7	20,3±0,7	19,7±1,0	31,3±1,0
57	12,7±0,3	13,3±0,3	26,7±1,0	20,3±1,4	20,0±1,4	31,3±0,3	NA	NA	21,0±0,7	20,0±0,7	19,7±0,3	30,0±0,7
292	NA ²	NA	0	0	11,3±0,7	12,3±0,3	NA	NA	0	0	9,7±0,3	11,0±0,7

Примечание: 1. Уровень чувствительности к гентамицину по результатам оценки эффективности каждой вытяжки на конкретный срок наблюдения оценивали на соответствие требованиям EUCAST-2018. 2. NA - исследования не проводили.

Наши результаты по активности гентамицина в костном цементе совпадают с данными зарубежных авторов, проводивших аналогичные опыты [8, 20, 21]. В единичных публикациях приведены сведения по оценке вытяжек из антимикробного костного цемента в отношении полирезистентных микроорганизмов различных видов [22]. В этом исследовании авторы показали, что через 24 часа на поверхности костного цемента с гентамицином происходит и рост, и адгезия полирезистентных клинических штаммов: *S. aureus* 3A10 MS-GS, *S. aureus* 5/7 MRSA/VRSA/GRSA, *S. epidermidis* 137/25 MR/GI, *S. hominis* 126/26 MR/GI, *S. epidermidis* 8/28 MR/GR, *S. haemolyticus* 8/28 MR/GR, *S. epidermidis* 3/2 MR/GR, *E. coli* 7A27 G-S**.

Полученные нами показатели эффективности вытяжки из костного цемента с гентамицином и ванкомицином (2) свидетельствуют об отсутствии усиления действия за счет второго антибиотика, что совпадает с данными других авторов, которые продемонстрировали полную элиминацию ванкомицина из полиметилметакрилатных дисков к 12 дню микробиологическим методом [23]; а также методом жидкостной хроматографии показали, что содержание ванкомицина в вытяжке находилось ниже уровня минимальной ингибирующей концентрации на 14-е сутки эксперимента [4]. Внесение в костный цемент 3% и 5% повидаргола, представляющего собой нанокластеры серебра, стабилизированного низкомолекулярным поливинилпир-

** – MS-GS – methicillin-susceptible & gentamicin-susceptible; MR-GR – methicillin-resistant & gentamicin-resistant; MR-GI – methicillin-resistant & gentamicin-intermediate; MRSA/VRSA/GRSA – methicillin-resistant, vancomycin-resistant & gentamicin-resistant; G-S – gentamicin-susceptible.

ролидоном, способствует усилению антимикробного эффекта вытяжек (3-4) в отношении чувствительного и резистентного штаммов стафилококка. Однако данные композиции проявляют цитотоксический эффект на фибробласты кожи эмбриона человека в культуре. Антимикробные композиции (5-6), содержащие 1% повидаргол и высокомолекулярный ПВП 1% и 8% соответственно, не токсичны в культуре клеток фибробластов, оказывают пролонгированное бактерицидное действие в отношении обоих штаммов *S. epidermidis*, снижая уровень микробной популяции на $3 \log_{10}$.

ВЫВОДЫ

В настоящее время исследователи ведут поиск альтернативных антибиотикам средств и комбинаций на основе веществ, способных снижать уровень микробной популяции, воздействовать на маркеры антибиотикорезистентности и факторы (фенотипические и генотипические) патогенности микроорганизмов. В рутинной практике операцию по резэндопротезированию проводят оптимально через 6-12 месяцев после установки спейсера, учитывая эффективность санации полости сустава. Введение в костный цемент нетоксичных доз нанокластеров серебра и высокомолекулярного полимера способствует пролонгации антимикробного действия спейсера на протяжении 292 дней (срок наблюдения). В работе показана перспективность использования серебросодержащего антисептика, разрешенного для местного применения в клинике, и высокомолекулярного поливинилпирролидона как компонента детоксикации и пролонгации антимикробного эффекта композиции на основе костного цемента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ревизионное эндопротезирование тазобедренного сустава / под ред. Д. Джакофски, Э. Хедли. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014: 328 с. [Revizionnoe ehndoprotezirovaniye tazobedrennogo sustava / pod red. D. Dzhakofski, E. Hedli. M.: GEOTAR-Media, 2014: 328 s. (In Russ)].
2. Кильметов Т.А., Ахтямов И.Ф. и др. Локальная антибиотикотерапия при инфекции области эндопротеза сустава. Казанский медицинский журнал. 2014; 3 (95): 405-411. [Kil'metov T.A., Ahtyamov I.F. i dr. Lokal'naya antibiotikoterapiya pri infekcii oblasti ehndoproteza sustava. Kazanskiy medicinskiy zhurnal. 2014; 3 (95): 405-411 (In Russ)].
3. Scharfenberger A., Clark M., Lavoie G. et al. Treatment of an infected total hip replacement with the PROSTALAC system. Part 1: Infection resolution. Can. J. Surg. 2007; 50 (1): 24-28.
4. Дзюба Г.Г. Ортопедическая хирургия остеомиелитических кокситов: Автореф. дисс... докт. мед. наук. Омск, 2018: 44 с. [Dzyuba G.G. Ortopedicheskaya hirurgiya osteomieliticheskikh koksitov: Avtoref. diss... dokt. med. nauk. Omsk, 2018: 44 s. (In Russ)].
5. Комаров Р.Н., Митрофанов В.Н., Новиков А.В., Королев С.Б. Тактика лечения инфекционных осложнений после эндопротезирования тазобедренного сустава. Травматология и ортопедия России. 2016; 22 (4): 25-34. [Komarov R.N., Mitrofanov V.N., Novikov A.V., Korolev S.B. Taktika lecheniya infekcionnyh oslozhnenij posle ehndoprotezirovaniya tazobedrennogo sustava. Travmatologiya i ortopediya Rossii. 2016; 22 (4): 25-34 (In Russ)].
6. Гатина Э.Б., Митронин М.И., Ахтямов И.Ф. и др. Инфекционные осложнения как показатели смены вариантов лечения в травматологии и ортопедии. Практическая медицина. 2013; 2 (69): 34-36. [Gatina E.B., Mitronin M.I., Ahtyamov I.F. i dr. Infekcionnye oslozhneniya kak pokazateli smeny variantov lecheniya v travmatologii i ortopedii. Prakticheskaya medicina. 2013; 2 (69): 34-36 (In Russ)].
7. Mendel V., Simanowski H.J., Scholz H.C., Heymman H. Therapy with gentamicin-PMMA beads, gentamicin-collagen sponge, and cefazolin for experimental osteomyelitis due to *Staphylococcus aureus* in rats. Arch. Orthopaed. Trauma Surg. 2005; 125: 363-368.
8. Привольнев В.В., Родин А.В., Каракулина Е.В. Местное применение антибиотиков в лечении инфекций костной ткани. Клини. Микроб. и Антимикр. Химиотер. 2012; 14 (2): 118-131. [Privol'nev V.V., Rodin A.V., Karakulina E.V. Mestnoe primeneniye antibiotikov v lechenii infekcij kostnoj tkani. Klin. Mikrob. i Antimikr. Himioter. 2012; 14 (2): 118-131 (In Russ)].
9. Кимайкина О.В. с соавт. Оценка антимикробной активности антибиотиков в костном цементе для спейсеров. Проблемы медицинской микологии. 2018; 20 (2): 76-77. [Kimajkina O.V. s soavt. Ocenka antimikrobnnoj aktivnosti antibiotikov v kostnom cemente dlya spejserov. Problemy medicinskoj mikologii. 2018; 20 (2): 76-77 (In Russ)].
10. Афиногенова А.Г. Микробиологические аспекты разработки и применения антисептиков и антисептических средств для профилактики и лечения раневых инфекций: Автореф. дисс... докт. биол. наук. М., 2011: 51 с. [Afinogenova A.G. Mikrobiologicheskie aspekty razrabotki i primeneniya antiseptikov i antisepticheskikh sredstv dlya profilaktiki i lecheniya

- ranevnyh infekcij: Avtoref. diss... dokt. biol. nauk. M., 2011: 51 s. (In Russ)].
11. *Сборник руководящих методических материалов по токсиколого-гигиеническим исследованиям полимерных материалов и изделий на их основе медицинского назначения МЗ СССР*. М., 1987: 98 с. [Sbornik rukovodyashchih metodicheskikh materialov po toksikologo-gigienicheskim issledovaniyam polimernykh materialov i izdelij na ih osnove medicinskogo naznacheniya MZ SSSR. M., 1987: 98 s. (In Russ)].
 12. МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам». Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации. М., 2004. [МУК 4.2.1890-04 «Opreделение chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antibakterial'nym preparatam». Gosudarstvennoe sanitarno-ehpidemiologicheskoe normirovanie Rossijskoj Federacii. M., 2004 (In Russ)].
 13. *Афиногенов Г.Е., Краснова М.В.* Чашечный метод оценки эффективности дезинфектантов и антисептиков. Методические рекомендации МЗ РФ № 2003/17. СПб., 2004: 13 с. [Afinogenov G.E., Krasnova M.V. Chashechnyj metod ocenki ehffektivnosti dezinfektantov i antiseptikov. Metodicheskie rekomendacii MZ RF № 2003/17. SPb., 2004: 13 s. (In Russ)].
 14. *Kramer A., et al.* Octenidine, Chlorhexidine, Iodine and Iodophores. Preprint: Georg Thieme Verlag KG. 2008: 85 p.
 15. *Асташкин Е.И., Ачкасов Е.Е., Афонин К.В. и др.* Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. М.: Профиль-2С, 2010: 358 с. [Astashkin E.I., Achkasov E.E., Afonin K.V. i dr. Rukovodstvo po laboratornym zivotnym i al'ternativnym modelyam v biomedicinskih issledovaniyah / pod red. N.N. Karkishchenko, S.V. Gracheva. M.: Profil'-2S, 2010: 358 s. (In Russ)].
 16. *Руководство Р 4.2.2643-10 «Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности»*. М., 2010: 740 с. [Rukovodstvo R 4.2.2643-10 «Metody laboratornyh issledovaniy i ispytaniy dezinfekcionnyh sredstv dlya ocenki ih ehffektivnosti i bezopasnosti». M., 2010: 740 s. (In Russ)].
 17. *Методические указания по использованию культуры диплоидных клеток человека, рекомендуемых для токсиколого-гигиенических исследований*. М., 1991: 23 с. [Metodicheskie ukazaniya po ispol'zovaniyu kul'tury diploidnyh kletok cheloveka, rekomenduemyh dlya toksikologo-gigienicheskikh issledovaniy. M., 1991: 23 s. (In Russ)].
 18. *Фолькер Бюлер. Коллидон®*. Поливинилпирролидон для фармацевтической промышленности / Перевод с англ. под ред. д.ф.н. К.В. Алексеева. BASF, 2001: 310 с. [Fol'ker Byuler. Kollidon®. Polivinilpirrolidon dlya farmaceuticheskoy promyshlennosti / Perevod s angl. pod red. d.f.n. K.V. Alekseeva. BASF, 2001: 310 s. (In Russ)].
 19. *Афиногенова А.Г., Афиногенов Г.Е., Краева Л.А. и др.* Разработка модели in vivo для оценки антитоксического действия полимеров. Проблемы медицинской микологии. 2018; 20 (2): 49. [Afinogenova A.G., Afinogenov G.E., Kraeva L.A. i dr. Razrabotka modeli in vivo dlya ocenki an-titoksicheskogo dejstviya polimerov. Problemy medicinskoj mikologii. 2018; 20 (2): 49 (In Russ)].
 20. *Gallo J., Kolar M., Florschütz A.V., et al.* In vitro testing of gentamicin-vancomycin loaded bone cement to prevent prosthetic joint infection. Biomed. Papers. 2005; 149 (1): 153-158.
 21. *Cui Quanjun, Mihalko William M., Shields John S., et al.* Antibiotic-Impregnated cement spacers for the treatment of infection associated with total hip or knee arthroplasty. J. Bone Joint Surg. Am. 2007; 89: 871-882.
 22. *E. Bertazzoni Minelli, T. Della Bora, A. Benini.* Different microbial biofilm formation on polymethylmethacrylate (PMMA) bone cement loaded with gentamicin and vancomycin. Anaerobe. 2011; 17: 380-383.
 23. *Mader J.T., Calhoun J., Cobos J.* In Vitro Evaluation of antibiotic diffusion from antibiotic-impregnated biodegradable beads and polymethylmethacrylate beads. Antimicrob. Agents and Chemother. 1997; 41 (2): 415-418.

Поступила в редакцию журнала 12.11.2018

Рецензент: В.В. Гостев



РЕЗИСТЕНТНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ СЕРОГРУПП *STREPTOCOCCUS* SPP. К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ

¹Степанов А.С. (ассистент кафедры)*, ^{1,2}Васильева Н.В. (директор НИИ, зав. кафедрой), ¹Щербина Е.С. (студент), ³Каменева О.А. (зав. лаб.), ¹Косякова К.Г. (доцент кафедры)

Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова: ¹ кафедра медицинской микробиологии и ² НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина; ³ Детская городская больница №22, Санкт-Петербург, Россия

Оценили чувствительность к антимикробным препаратам 735 изолятов *Streptococcus* spp., выделенных от пациентов двух стационаров Санкт-Петербурга. Выявлено большое разнообразие спектров антибиотикорезистентности в зависимости от группы и вида микроорганизмов. Доля нечувствительных к антимикробным препаратам изолятов была выше среди зеленящих стрептококков, чем среди β -гемолитических и *S. pneumoniae*. Наибольшей активностью обладали препараты группы природных пенициллинов, в то время как устойчивость к тетрациклину и эритромицину была довольно высока среди всех серогрупп. Отмечен рост числа нечувствительных штаммов к фторированным хинолонам среди *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. pyogenes*, *Streptococcus* группы «Viridans», стрептококков группы *M*.

Ключевые слова: антимикробные препараты, антибиотикорезистентность, стрептококки

RESISTANCE OF *STREPTOCOCCUS* SPP. SEROGROUPS TO ANTIMICROBIAL AGENTS

¹Stepanov A.S. (assistant of the department), ^{1,2}Vasilyeva N.V. (director of the institute, head of the department), ¹Shcherbina E.S. (student), ³Kameneva O.A. (head of the laboratory), ¹Kosyakova K.G. (associate professor of the department)

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov: ¹Department of medical microbiology and ² Kashkin Research Institute of Medical Mycology; ³Children's Municipal Hospital №22, St. Petersburg, Russia

Susceptibility to antimicrobial agents was evaluated for 735 isolates of *Streptococcus* spp. isolated from patients of two hospitals in St. Petersburg. A wide variety of antibiotic resistance spectra was revealed depending on serological group of microorganisms. Amount of multidrug resistant isolates was higher among green streptococci than among β -hemolytic and *S. pneumoniae*. The highest susceptibility was observed to group of natural penicillins, while resistance to tetracycline and erythromycin was quite high among all serogroups. Increased number of fluoroquinolones resistant strains was found in *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. pyogenes*, *Streptococcus* "Viridans" and streptococcus group *M*.

Key words: antibiotics, streptococci, resistance to antimicrobials

ВВЕДЕНИЕ

Стрептококки – возбудители различных заболеваний человека, в то же время являющиеся комменсалами слизистых оболочек, входя в состав нормальной микробиоты тела человека [1-3]. Наряду с этим известно, что стрептококки вызывают инфекционные процессы, локализация которых определяется типом возбудителя. Так, стрептококки группы F чаще встречаются при патологии желудочно-кишечного тракта (например, при аппендицитах) [4], а *Streptococcus pneumoniae* описаны в литературе в качестве возбудителей пневмоний и фарингитов [5, 6].

Отметим, что устойчивость к антимикробным препаратам среди *Streptococcus* spp. длительное время сохранялась на невысоком уровне [7, 8]. Однако в последнее время выявлен рост устойчивости среди *S. pneumoniae* и стрептококков группы В к бета-лактамам антибиотикам [9-11]. Также установлен рост устойчивости и к препаратам других групп (макролиды, азалиды, фторхинолоны) среди как *S. pneumoniae*, так и стрептококков других групп, что приводит к росту летальности среди пациентов с тяжелой симптоматикой, а также осложняет терапию инфекционных состояний у пациентов с аллергией на β -лактамы антибиотиков [10, 12, 13].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение и идентификация.

Выполнено исследование 735 изолятов *Streptococcus* spp., выделенных на базе больницы им. Петра Великого и детской городской больницы №22 г. Санкт-Петербурга в 2017 г., из них 464 изолята были получены от взрослых и 41 – от детей с гнойно-септическими инфекциями (Таблица 1).

Таблица 1

Структура исследованной выборки *Streptococcus* spp.

Вид	Городская больница №22 (n)	Больница им. Петра Великого (n)	Общий итог
<i>S. agalactiae</i>	20	4	24
<i>S. dysgalactiae</i>	6	43	49
<i>S. mitis</i>	40	32	72
<i>S. pneumoniae</i>	29	85	114
<i>S. pyogenes</i>	5	54	59
<i>Streptococcus</i> группы «Viridans»	0	316	316
<i>Streptococcus</i> группы D	0	16	16
<i>Streptococcus</i> группы F	0	5	5
<i>Streptococcus</i> группы G	44	14	58
<i>Streptococcus</i> группы H	4	0	4
<i>Streptococcus</i> группы K	12	0	12
<i>Streptococcus</i> группы M	0	6	6
Общий итог	160	575	735

Первичный посев производили на колумбийский агар с 5% содержанием взвеси эритроцитов барана, инкубацию осуществляли в течение 24 часов в капнофильных условиях (15-20% CO₂). *Streptococcus* spp. идентифицировали с помощью теста латекс-агглютинации Strep Grouping Kit (Thermo Scientific) и по биохимическим свойствам с помощью тест-систем ErbaLachema StreptoTest 24 или автоматизированным методом с применением прибора WalkAway 40 plus (Siemens), в качестве скрининг-тестов для идентификации оценивали чувствительность к оптохину (1 мг, Oxoid) и бацитрацину (0,04 ЕД, Oxoid). Идентификацию α -гемолитических стрептококков выполняли с использованием тестов чувствительности к оптохину

* Контактное лицо: Степанов Александр Сергеевич, e-mail: Aleksandr.Stepanov@szgmu.ru

(Oxoid, диски с нагрузкой 5 мкг), желчи (ФБУ НИИ Пастера, диски стандартные). Идентификацию проводили до группы *Streptococcus* spp. согласно классификации Ленсфильд, биохимические свойства определяли с целью уточнения принадлежности к группам изолятов, не типизируемых сыворотками стандартного набора. Принадлежность α-гемолитических стрептококков к виду *S. pneumoniae* выявляли также с помощью теста латекс-агглютинации на общий капсульный полисахаридный антиген пневмококков.

Оценка чувствительности.

Чувствительность к антимикробным препаратам оценивали в соответствии с действующими нормативными документами [14, 15]. Для этого на поверхность Мюллер-Хинтон агара с добавлением 5% дефибринированной лошадиной крови и 20 мг/л β-НАД тампоном, смоченным в стандартной суспензии микроорганизма, наносили чистую культуру микроорганизма с покрытием поверхности агара штрихами под углом 60°. Стандартную суспензию приготавливали из ресуспендированной в физиологическом растворе (4 мл) культуры с плотностью суспензии по McFarland – 0,5. Оценку плотности суспензии проводили с помощью

Erba LaChema DensiLaMeter®. Скрининг резистентности к бета-лактамам *S. pneumoniae* и *Streptococcus* группы «Viridans» выполняли с применением дисков с оксациллином (1 мкг) (Oxoid). Для оценки чувствительности к пенициллину стрептококков других групп использовали диски с бензилпенициллином (1 ЕД) (Oxoid). Чувствительность к другим антимикробным препаратам (АМП) также определяли диско-диффузионным методом с помощью дисков Oxoid с левофлоксацином (5 мкг), эритромицином (15 мкг), клиндамицином (2 мкг), тетрациклином (30 мкг), ванкомицином (5 мкг) и для всех изолятов за исключением *Streptococcus* группы «Viridans» – с линезолидом (10 мкг).

Статистическая обработка.

Статистический анализ проводили с использованием статистического пакета R 3.3.2, применяли коэффициент Фишера и тест Хи-Квадрат. Сравнение распределения диаметров зон задержек роста и пороговых концентраций между группами *Streptococcus* spp. выполняли методом попарного сравнения средних.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Видовой состав *Streptococcus* spp. различался в зависимости от типа биоматериала (Рис. 1).

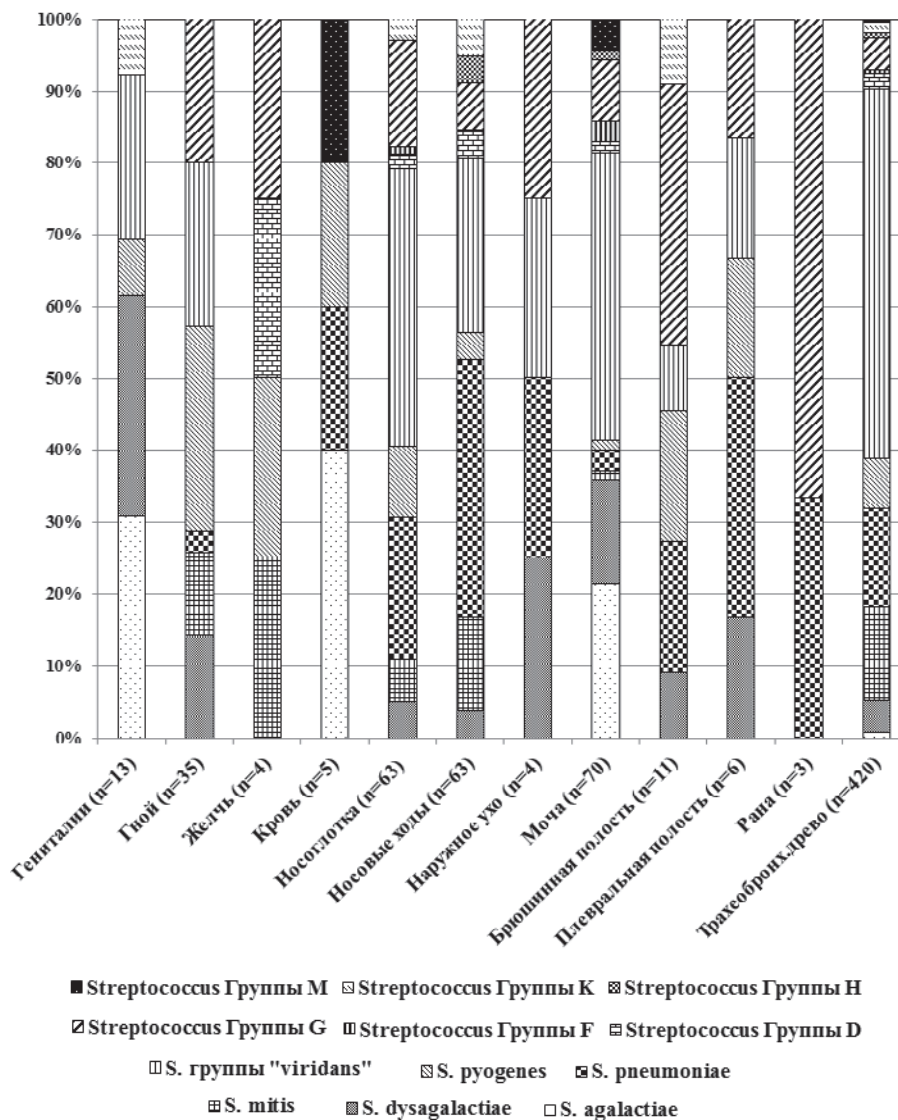


Рис. 1. Спектр видов *Streptococcus* spp., выделенных из разных образцов клинического материала.

Среди выделенных штаммов преобладали изоляты *Streptococcus* группы «Viridans» (42,1%), *S. pneumoniae* (15,3%), *S. mitis* (10,3%), *S. pyogenes* (7,9%), *Streptococcus* группы G (8,1%).

S. pyogenes наиболее часто встречался в отделяемом из ран (28,6%), желчи (25,0%), крови (20,0%) и брюшной полости (18,2%). *S. pneumoniae* был характерен для отделяемого из ран и плевральной полости (по 33,3%), носоглотки (35,9%), синусов (25,0%) и крови (20,0%). Стрептококки группы G преобладали в образцах раневого отделяемого (66,7%), выпотах в брюшную полость (36,4%) и пробах желчи (25,0%). *S. agalactiae* и *S. dysagalactiae* чаще остальных видов обнаруживали в отделяемом половых органов (61,5% от всех изолятов *Streptococcus* spp. из органов мочеполового тракта). Стрептококки групп H, K, M являлись наиболее редкими представителями рода *Streptococcus* и были выделены из разных типов биоматериала. *Streptococcus* группы «Viridans» преобладали в отделяемом трахеобронхиального дерева (ТБД) (51,4%), в моче (40,0%) и в отделяемом из ЛОР-органов (38,6%).

Было отмечено видовое разнообразие в отделяемом ТБД (12 видов *Streptococcus* spp.), образцах мочи (11 видов), а также в отделяемом из зева и носа (по 9 видов). Шестью видами *Streptococcus* spp. было представлено отделяемое из брюшной полости и ран, пятью видами – из органов половой системы.

При оценке чувствительности *Streptococcus* spp. к АМП установлено, что уровень и спектры резистентности различались в зависимости от группы и вида микроорганизмов. Отметим, что доля нечувствительных к антимикробным препаратам изолятов была выше среди зеленящих стрептококков, чем среди β-гемолитических и *S. pneumoniae* (Рис. 2).

Выявлено, что *S. pneumoniae*, *S. mitis* и стрептококки групп F, G, K и H обладали наименьшим уровнем устойчивости к левофлоксацину (до 31,4%), к препаратам других групп – от 40,0 до 91,3%. Уровень устойчивости к клиндамицину был достоверно выше среди стрептококков групп H, K и F и *S. agalactiae* (более 50,0% нечувствительных изолятов), среди остальных групп он не превышал 33,3%. Отмечали высокий уровень устойчивости к эритромицину среди всех групп стрептококков, при этом для стрептококков группы G (25,0%) и *S. pyogenes* (32,7%) он был относительно низким. Среди всех исследованных групп уровень устойчивости к тетрациклину превышал 57,1%, а к природным пеницилинам был достоверно выше у стрептококков группы M (60,0%). Уровень устойчивости к оксациллину среди *S. pneumoniae* составил 28,6% и был достоверно ниже, чем у *S. mitis* и в группе «Viridans» (54,1 и 55,1% соответственно) (тест Хи-Квадрат, $p < 0,0001$). Устойчивости к препаратам второй линии терапии, ванкомицину и линезолиду в эксперименте не выявили.

ОБСУЖДЕНИЕ

Стрептококки до сих пор актуальны как возбудители инфекций человека, но также являются и комменсалами, населяющими открытые слизистые оболочки человека [16]. Понимание степени вовлеченности определенных серогрупп *Streptococcus* spp. в патологический процесс позволит дифференцировать возможных контаминантов образца от истинных возбудителей инфекций соответствующей локализации.

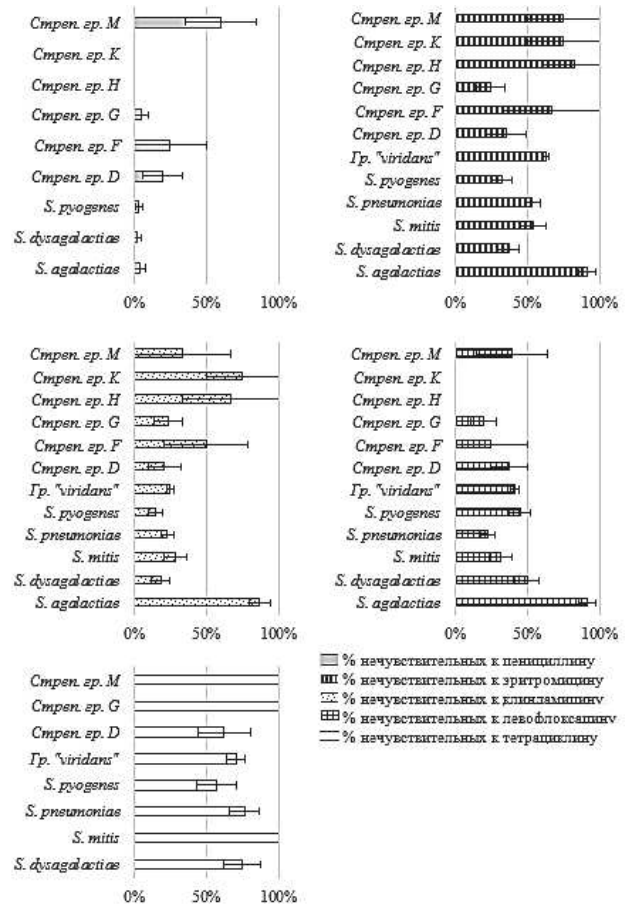


Рис. 2. Частота обнаружения нечувствительных к антимикробным препаратам штаммов (%) среди *Streptococcus* spp.

Полученные данные свидетельствуют о том, что серогруппа *Streptococcus* spp. может быть показателем типа патологического процесса, вызываемого этим микроорганизмом. Мы выявили статистически значимую связь *S. pyogenes* с нагноительными процессами, *S. pneumoniae* – с инфекциями носоглотки, *S. agalactiae* и *S. dysagalactiae* – с инфекциями мочеполового аппарата, стрептококков группы G – с инфекционными процессами в области послеоперационных ран. Установлено, что чувствительность к антимикробным препаратам различалась в зависимости от серологической группы *Streptococcus* spp. и длительное время сохранялась на высоком уровне, однако в последние годы отмечен рост числа нечувствительных изолятов [17]. По нашим наблюдениям, наибольшей активностью обладали препараты группы природных пенициллинов, в то время как устойчивость к тетрациклину и эритромицину была довольно высока среди всех исследуемых групп. Фторированные хинолоны остаются эффективным средством для лечения стрептококковых инфекций, однако обнаружен рост числа нечувствительных к препаратам этой группы изолятов среди *S. agalactiae*, *S. dysagalactiae*, *S. pyogenes*, *S. «Viridans»*, стрептококков группы M. Понимание выявленных закономерностей и тенденций изменения чувствительности стрептококков к антимикробным препаратам позволит направленно корректировать эмпирическую антимикробную терапию, основываясь на предварительных результатах бактериологического исследования, до получения данных антибиотикограммы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявленные закономерности распределения *Streptococcus* spp. различных серогрупп среди пациентов с клиническими проявлениями обуславливают значимость метода серотипирования для этиологи-

ческой расшифровки вызванных ими заболеваний. Кроме того, использование серотипирования целесообразно для корректировки направления как эмпирической антимикробной терапии уже в первые часы после забора материала, так и протокола бактериологического исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Frandsen E.V.G., Pedrazzoli V., Kilian M. Ecology of viridans streptococci in the oral cavity and pharynx. *Mol. Oral Microbiol.* 1991; 6 (3): 129-133.
2. Margolis E., Yates A., Levin B.R. The ecology of nasal colonization of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Staphylococcus aureus*: the role of competition and interactions with host's immune response. *BMC Microbiol.* 2010; 10 (1): 59.
3. Merritt J., Qi F. The mutacins of *Streptococcus mutans*: regulation and ecology. *Mol. Oral Microbiol.* 2012; 27 (2): 57-69.
4. Bannatyne R.M., Randall C. Ecology of 350 isolates of group F streptococcus. *Am. J. Clin. Pathol.* 1977; 67 (2): 184-186.
5. Кравченко Н.А., Яковенко О.Н., Свистунов В.В. и др. Этиология летальных пневмоний по результатам микробиологических и молекулярно-генетических исследований секционного материала. *Инфекционные Болезни Новости Мнения Обучение.* 2016; 4 (17): 93-99. [Kravchenko N.A., Yakovenko O.N., Svistunov V.V. i dr. Etiologiya letal'nyh pnevmonij po rezul'tatam mikrobiologicheskikh i molekulyarno-geneticheskikh issledovaniy sekcionnogo materiala. *Infekcionnye Bolezni Novosti Mneniya Obuchenie.* 2016; 4 (17): 93-99 (In Russ)].
6. Полушкина А.В., Новгородова С.Д. О причинах различий в этиологической структуре внебольничной и внутрибольничной пневмоний. *Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук.* 2016; 5(3): 125-126. [Polushkina A.V., Novgorodova S.D. O prichinah razlichij v ehtiologicheskoy strukture vnebol'nichnoj i vnutribol'nichnoj pnevmonij. *Aktual'nye problemy gumanitarnyh i estestvennyh nauk.* 2016; 5(3): 125-126 (In Russ)].
7. Baquero F. Evolving resistance patterns of *Streptococcus pneumoniae*: a link with long-acting macrolide consumption? *J. Chemother.* 1999; 11 (1): 35-43.
8. Dowson C.G., Coffey T. J., Kell C., Whiley R.A. Evolution of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*; the role of *Streptococcus mitis* in the formation of a low affinity PBP2B in *S. pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 1993; 9 (3): 635-643.
9. Hakenbeck R., Grebe T., Zähler D., Stock J. B. beta-lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*: penicillin-binding proteins and non-penicillin-binding proteins. *Mol. Microbiol.* 1999; 33 (4): 673-678.
10. Granizo J.J., Aguilar L., Casal J., et al. *Streptococcus pneumoniae* resistance to erythromycin and penicillin in relation to macrolide and β -lactam consumption in Spain (1979-1997). *J. Antimicrob. Chemother.* 2000; 46 (5): 767-773.
11. Laible G., Spratt B.G., Hakenbeck R. Interspecies recombinational events during the evolution of altered PBP 2x genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 1991; 5 (8): 1993-2002.
12. Baylay A.J., Piddock L.J. Clinically relevant fluoroquinolone resistance due to constitutive overexpression of the PatAB ABC transporter in *Streptococcus pneumoniae* is conferred by disruption of a transcriptional attenuator. *J. Antimicrob. Chemother.* 2014; 70 (3): 670-679.
13. Cilloniz C., Albert R. K., Liapikou A., et al. The effect of macrolide resistance on the presentation and outcome of patients hospitalized for *Streptococcus pneumoniae* pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2015; 191 (11): 1265-1272.
14. Козлов Р.С., Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В. и др. Клинические рекомендации. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. М.: Расширенное совещание Межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии, 2014; 1: 154. [Kozlov R.S., Suhorukova M.V., Ejdel'shtejn M.V. i dr. Klinicheskie rekomendacii. Opredelenie chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antimikrobnym preparatam. M.: Rasshirennoe soveshchanie Mezhr-regional'noj associacii po klinicheskoj mikrobiologii i antimikrobnoj himioterapii, 2014; 1: 154 (In Russ)].
15. МУК 4.2.1890-04 Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания. 2004. [МУК 4.2.1890-04 Opredelenie chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antibakterial'nym preparatam. Metodicheskie ukazaniya. 2004 (In Russ)].
16. Сбойчаков В.Б., Москалёв А.В., Андреев В.А. и др. Медицинская микробиология. 2017. [Sbojchakov V.B., Moskalyov A.V., Andreev V.A. i dr. *Medicinskaya mikrobiologiya.* 2017 (In Russ)].
17. Blanquart F., Lehtinen S., Fraser C. An evolutionary model to predict the frequency of antibiotic resistance under seasonal antibiotic use, and an application to *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. R. Soc. B.* 2017; 284 (1855): 20170679c.

Поступила в редакцию журнала 25.09.2018

Рецензент: Н.С. Козлова



ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ В ЖУРНАЛ «ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ»

Журнал «Проблемы медицинской микологии» нацелен на публикацию оригинальных, ранее не опубликованных в других изданиях в России или за рубежом, статей, научных обзоров, дискуссионных, рецензий на книги, методических разработок, хроники и информации. Предварительные сообщения не принимаются. Статьи необходимо сопровождать направлением от учреждения (-й), в котором (-ых) выполнена работа.

Статьи представляются на русском языке с обязательным расширенным резюме на английском языке объемом не более 20 строк. Можно представлять статьи на английском языке с рефератом на русском языке в объеме до 20 строк.

Статьи представляются в редакцию по почте с приложением диска (с распечаткой текста на бумаге в 2-х экземплярах) или по электронной почте, подготовленными в текстовом редакторе Win Word. Статьи должны быть напечатаны шрифтом № 12 через 1,5 интервала. Все страницы должны быть пронумерованы.

Размер рукописей не должен превышать 12 машинописных страниц, включая рисунки, таблицы, фотографии и подписи к ним, список цитированной литературы, представляемые на отдельных листах. Количество иллюстраций не должно превышать двух страниц при их плотном размещении друг к другу.

Рукопись статьи подписывается автором (соавторами), на отдельной странице написать ф.и.о. (полностью) одного из авторов, его должность, адрес электронной почты (для связи) и номер телефона.

Авторское право.

Согласно статье 1228 (глава 69) Гражданского Кодекса РФ часть 4, раздел VII (Права на результаты интеллектуальной деятельности и средства индивидуализации), автором результата интеллектуальной деятельности признается гражданин, творческим трудом которого создан такой результат.

Не признаются авторами результата интеллектуальной деятельности граждане, не внесшие личного творческого вклада в создание такого результата, в том числе оказавшие его автору только техническое, консультационное, организационное или материальное содействие или помощь либо только способствовавшие оформлению прав на такой результат или его использованию, а также граждане, осуществлявшие контроль за выполнением соответствующих работ.

Правила оформления статей:

Сначала пишется название статьи заглавными буквами (шрифт 12 – жирный). Затем через 2 интервала указываются фамилии авторов, инициалы и должности (шрифт 12 – жирный). Далее через 2 интервала пишется название учреждения, в котором выполнена работа. Затем через 2 интервала печатать резюме на русском языке (без написания слова «резюме»). Через 2 интервала указать до 7 ключевых слов. Затем через 2 интервала (шрифт – 12) пишется заголовок на английском языке, фамилии, инициалы и должности автора (-ов), резюме (без написания слов «abstract, summary») и ключевые слова (не более 7).

Затем через 3 интервала и с красной строки печатать текст статьи в следующем порядке: краткое введение, материалы и методы, результаты и их обсуждение, выводы, цитированная литература.

Латинские названия грибов необходимо писать курсивом; если в заголовке названы род и вид гриба, то после него следует указывать автора, впервые писавшего вид (напри-

мер, *Aspergillus fumigatus* Fres.); в тексте такая форма уже не повторяется и при повторном упоминании гриба название рода сокращают до первой буквы (например, при первом написании в тексте *Aspergillus fumigatus*, при повторениях - *A. fumigatus*).

Автор (-ы) вида должен (-ны) быть указан (-ы) не только в заголовке к статье, но и при первом упоминании в тексте (если нет этого в заголовке) и в возможном списке видов. В подписях к рисункам и в надписях к таблицам полные названия рода и вида приводятся один раз.

Названия учреждений при первом упоминании в тексте даются полностью, и сразу же в скобках приводят их принятые сокращения, которыми пользуются в последующем тексте статьи, например, Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова (ГБОУ ВПО СЗГМУ), Московская государственная медицинская академия им. И.М. Сеченова (ММА им. Сеченова) и т.д.

Четко писать и различать О, о, и 0 (нуль), 1 и I (единицу и заглавную латинскую I), I и J, q и g, заглавные буквы О по-русски и Q по-английски. Подстрочные примечания должны иметь сквозную нумерацию по всей статье. Содержание таблиц не должно дублировать текст. Таблицы должны иметь порядковые номера, если их больше одной.

Все термины, употребляемые в статье, должны строго соответствовать действующим номенклатурам (анатомической, гистологической и т.д.), названия лекарственных средств - Государственной Фармакопее, единицы физических величин - международной системе единиц (СИ).

Литература, упоминаемая в тексте (не должна быть старше 10 лет), приводится списком в конце статьи в том порядке, в котором она цитирована в тексте работы; соответствующие номера статей проставляются в тексте в квадратных скобках.

Рисунки (фото) должны иметь порядковые номера, на которые следует ссылаться в тексте статьи. Рисунки (фото) прилагаются в электронном виде. На микрофотографиях изображается масштаб, в подписях к ним необходимо указывать собственные увеличения объектива и окуляра, и, возможно, коэффициент усиления увеличения за счет дополнительных оптических приспособлений (например, для некоторых бинокулярных микроскопов x 1,5).

Оформление списка литературы.

1. Для книг указываются фамилии и инициалы авторов, название книги, место издания (город), издательство, год, общее количество страниц, например: *Васильева Н.В., Елинов Н.П.* Микроорганизмы - контаминанты и патогены - индукторы процессов старения больших зданий и помещений медицинского назначения, а также возбудители некоторых заболеваний людей (учебное пособие) / Под ред. Н. П. Елинова. – СПб.: КОСТА, 2009. 224 с.

2. Для статей, опубликованных в журналах, указываются фамилии и инициалы авторов, название статьи, название журнала, год, том, номер, первая и последняя страницы статьи, например: *Brinkman C., Vergidis P, Uhl J.* PCR-electrospray ionization mass spectrometry for direct detection of pathogens and antimicrobial resistance from heart valves in patients with infective endocarditis. *J.of Clin. Microbiol.* 2013; 51 (7): 2040-2046.

3. Для статей, опубликованных в сборниках, указываются фамилии и инициалы авторов, название статьи, название сборника, место издания (город), издательство, год, первая и последняя страницы статьи, например: *Елинов Н.П.* Низшие микросцисты и вызываемые ими микозы – беспокойная проблема будущего. Материалы 3-го Всеросс. конгресса по мед. микологии. М., 2005; VI: 44-46.

4. Для авторефератов диссертаций, например: *Хабибулина Ф.М.* Почвенная микобиота естественных и антропогенно нарушенных экосистем северо-востока европейской части России: Автореф. дисс... док. биол. наук. Сыктывкар,

2009: 40 с.

Для **русскоязычных литературных источников необходимо транслитерация**, т.е. дублирование в романском алфавите (латиница), например: *Авдеев С.Н., Белобородов В.Б., Белоцерковский Б.З. и др.* Нозокомиальная пневмония у взрослых. Российские национальные рекомендации. М., 2016: 128 с. [Avdeev S.N., Beloborodov V.B., Belotserkovskiy V.Z. i dr. Nozokomialnaya pnevmoniya u vzroslyih. Rossiyskie natsionalnyie rekomendatsii. M., 2016: 128 с.]

Редакция оставляет за собой право сокращать статьи и вносить редакционные исправления.

В случае возвращения автору рукописи статьи на переработку дата ее поступления сохраняется в течение 4 месяцев. При отклонении работы статья не подлежит возвращению автору.

В конце статьи, принятой к публикации, приводится фамилия рецензента.

Частота выпуска журнала: 1 номер в квартал, 1 том в год. Все статьи публикуются БЕСПЛАТНО.

Подписной индекс в общероссийском каталоге «Роспечать» - 83006

По вопросам размещения рекламы обращаться по адресу редакции (см. ниже).

Вся корреспонденция направляется по адресу: 194291, Санкт-Петербург, ул. Сантьяго-де-Куба, 1/28, НИИ ММ им. П.Н.Кашкина СЗГМУ им. И.И. Мечникова.

Тел: (812) 303-51-45; тел./факс: (812) 510-62-77

E-mail: elena.gukova@szgmu.ru или mycobiota@szgmu.ru

Заведующая редакцией: Гукова Елена Станиславовна

ВНИМАНИЮ АВТОРОВ СТАТЕЙ!

Направляя статью для размещения в журнале ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И.Мечникова» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (далее – Университет) «Проблемы медицинской микологии» автор статьи предоставляет Академии право использовать статью в любой форме и любым способом, предусмотренными п. 2 ст. 1270 Гражданского Кодекса Российской Федерации, в том числе: воспроизведение статьи; распространение статьи путем продажи или иного отчуждения его оригинала или экземпляров; сообщение в эфир; сообщение по кабелю; перевод или другая переработка статьи; доведение статьи до всеобщего сведения; передача права использования статьи третьим лицам (сублицензионный договор); извлечение и обработка метаданных статьи.

Автор статьи гарантирует, что он является обладателем передаваемых Университету прав (правообладателем). Территория, на которой допускается использование прав на статью, не ограничена.

Передача прав на статью осуществляется без выплаты автору статьи вознаграждения. Университет вправе исполь-

зовать статью в течение срока действия исключительного права правообладателя на статью. Автор предоставляет Университету право обработки своих персональных данных.

В связи с вышеизложенным, редакционная коллегия журнала «Проблемы медицинской микологии» просит авторов, **вместе с сопроводительным письмом от организации, присылать документ с текстом следующего содержания:**

«Направляя статью для размещения в журнале ГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И.Мечникова» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (далее – Университет) «Проблемы медицинской микологии», я (мы) _____ (указать ФИО) предоставляю (ем) Университету право использовать мою (нашу) статью _____ (название статьи) в любой форме и любым способом, указанным в «Правилах предоставления рукописей авторами» журнала «Проблемы медицинской микологии».

Сопроводительное письмо к статье должно быть написано и подписано собственноручно автором (авторами) статьи.



**Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова (СЗГМУ)
Научно-исследовательский институт медицинской микологии им. П.Н.Кашкина (НИИ ММ) СЗГМУ им. И.И. Мечникова**
Адрес редакции: 194291, Санкт-Петербург, ул. Сантьяго-де-Куба, 1/28. Тел.: (812) 303-51-45, факс (812) 510-62-77
E-mail: mycobiota@szgmu.ru. Заведующая редакцией: Е.С.Гукова.

**North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov
Kashkin Research Institute of Medical Mycology**
Address of Editorial Office: Santiago-de-Cuba str., 1/28, Saint Petersburg, 194291, RUSSIA.
Tel.: (812) 303-51-45, Fax (812) 510-62-77
E-mail: mycobiota@szgmu.ru. Manager of Editorial Office: E.S.Gukova

«ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ»

Per. № 77-1396 от 20.12.1999 г. ISSN 1999-6780

Журнал включен в реферативный журнал и базы ВИНТИ.

Сведения о журнале ежегодно публикуются в международной системе по периодическим и продолжающимся изданиям «Ulrich's Periodicals Directory».

Оригинал-макет — НИИ «Медицинской микологии им. П. Н. Кашкина СЗГМУ».

Подписано в печать 28.01.2019. Формат 60×90 1/8. Бумага офсетная. Гарнитура Times. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 7.5. Тираж 999 экз.